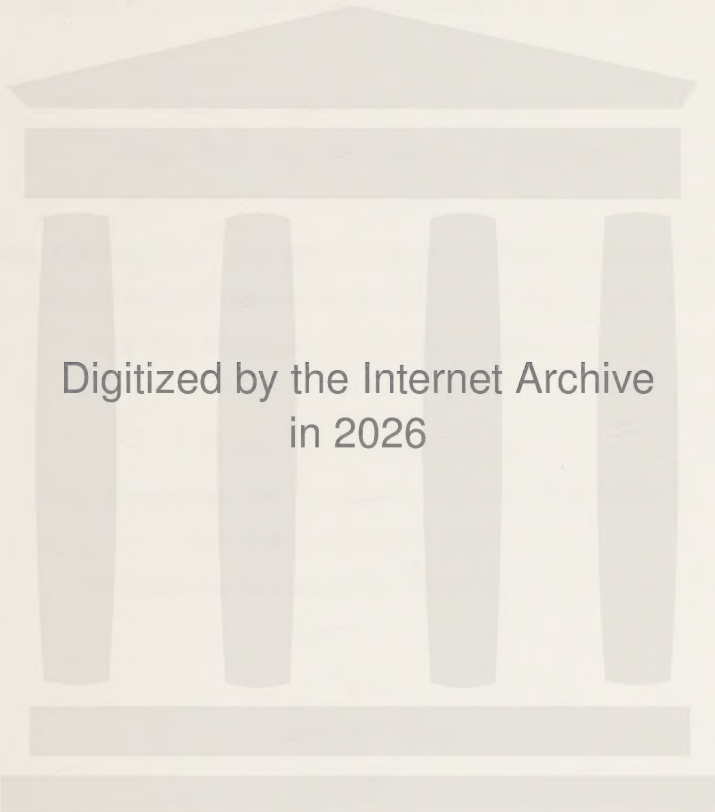


ÜBER DEN GLUCOSE- UND MITOCHONDRIALEN
ENERGIESTOFFWECHSEL DES ERYTHROCYTEN
VOM KARPFFEN (CYPRINUS CARPIO)
UND DER FORELLE (SALMO GAIRDNERI R.)

von

Michael Kalk

München 1985



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554826_0085

Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

ÜBER DEN GLUCOSE- UND MITOCHONDRIALEN ENERGIESTOFFWECHSEL
DES ERYTHROCYTEN VOM KARPFFEN (CYPRINUS CARPIO)
UND DER FORELLE (SALMO GAIRDNERI R.)

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Michael Kalk
aus
Hersbruck

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Priv. Doz. Dr. Dr.habil. J. Wittmann

Korreferent: Prof. Dr. M. Ruf

Tag der Promotion: 26. Juli 1985

Meinen Eltern, Irene und Edith

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. ALLGEMEINER TEIL	
1.1. Der kernlose Erythrocyt	1
1.2. Der kernhaltige Erythrocyt	8
1.3. Zielsetzung	14
2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN	
2.1. Material und Methoden	15
2.1.1. Reagenzien	15
2.1.2. Versuchstiere und Haltung	15
2.1.3. Blutuntersuchungen	17
2.1.3.1. Gewinnung der Erythrocyten	17
2.1.3.2. Untersuchungen im Vollblut	18
2.1.3.3. Inkubation	19
2.1.3.4. Metabolitenbestimmung	20
2.1.3.5. Enzyme	23
2.1.3.6. Messung des O ₂ -Verbrauches	23
2.1.4. Statistische Berechnung	23
2.2. Ergebnisse	24
3. DISKUSSION	55
4. ZUSAMMENFASSUNG	62
5. LITERATURVERZEICHNIS	66

Abkürzungen:

ADP	Adenosindiphosphat
ALD	Aldolase
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
DPGM	Diphosphoglyceratmutase
DPGP	Diphosphoglyceratphosphatase
EN	Enolase
GPI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HK	Hexokinase
IPP	Inosinpentaphosphat
LDH	Lactat-Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFK	Phosphofructokinase
PGK	Phosphoglyceratkinase
PGM	Phosphoglyceratmutase
PK	Pyruvatkinase
TCA	Trichloressigsäure
TPI	Triosephosphat-Isomerase

1. ALLGEMEINER TEIL

1.1. Der kernlose Erythrocyt

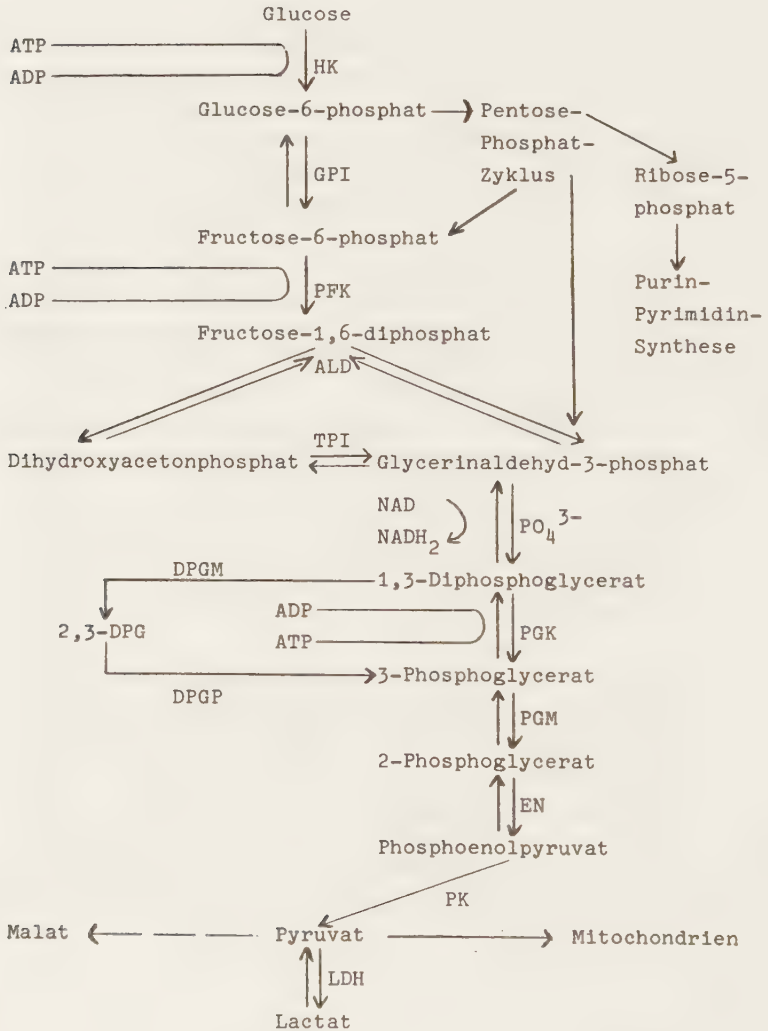
Erythrocyten sind seit langem Gegenstand intensiver Untersuchungen. Leichte Zugängigkeit, lange Vitalität unter in-vitro-Verhältnissen und eine verhältnismäßig einheitliche Zellpopulation sind wesentliche Gründe dafür, daß der Erythrocyt sich als Modell für verschiedene Probleme in der Forschung bewährt hat.

Auf dem Weg der Entwicklung zum Normocyten erfährt die jugendliche Form des Erythrocyten des Säugetieres strukturelle Veränderungen, die den Stoffwechsel grundlegend beeinflussen.

Im Retikuloeyten des Säugetieres können noch Zellkern, Ribosomen und Vesikel des Golgi-Apparates aufgefunden werden. Ferner besitzt die rote Blutzelle in diesem Entwicklungsstadium Mitochondrien (17,95). Diese Zellstrukturen halten im Retikuloeyten die Eiweißsynthese, den Porphyrin- und Purinstoffwechsel und die Atmung aufrecht.

Hingegen hat der ausgereifte Erythrocyt durch Verlust der genannten Zellorganellen diese Eigenschaften nicht mehr. Der Verlust der Mitochondrien hat weitreichende Folgen hinsichtlich des Energiestoffwechsels. Es fällt eine wesentliche Energiequelle weg, nämlich die oxidative Phosphorylierung. Die Zelle ist nunmehr darauf angewiesen, die Bildung von ATP, das die wichtigste energiereiche Verbindung der Zelle darstellt, über die Glyko-

Abb. 1: Abbau der Glucose in Erythrocyten



lyse bereitzustellen (95, 115). ATP stellt die Energie für den aktiven Ionentransport, die Na-K-Pumpe wie auch für andere Transportvorgänge bereit.

Außerdem ist ATP bei der Bewahrung der Zellform von Bedeutung. Es wird für die Synthese von Glutathion benötigt, das für die Erhaltung der Zellintegrität von entscheidender Bedeutung ist. Reduziertem Glutathion kommt im Stoffwechsel des Erythrocyten besondere Bedeutung zu. Es liegt im Erythrocyten in hoher Konzentration vor und gibt sein Elektron auf freie Radikale ab. Auf diese Weise schützt es Sulfhydrylgruppen von Membranen und Enzymen und wirkt einer Hämolyse entgegen.

Bekannt ist die Bedeutung von ATP für die Regulation von Enzymen. Durch allosterische Hemmung der Phosphofructokinase kann ATP Einfluß auf die Durchflußrate der Glykolyse nehmen (23).

Ferner hat ATP eine regulatorische Funktion bei der Beeinflussung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. ATP-abhängige Syntheseleistungen spielen dagegen im Zellstoffwechsel kaum eine Rolle.

Die zytoplasmatisch ablaufende Glykolyse, die neben der oxidativen Phosphorylierung den wichtigsten Stoffwechselweg zur ATP-Bildung darstellt, ist unter physiologischen Bedingungen reversibel; lediglich drei Schritte, nämlich die Hexokinase-, die Phosphofructokinase- und die Pyruvatkinasereaktion sind wegen ihres stark exergonischen Verlaufes nicht im thermodynamischen Gleichgewicht.

Die Irreversibilität dieser Schritte hat die Konsequenz, daß diese Reaktionen als Regulationsstufen für den Glucoseabbau besonders geeignet sind. Die Regulation der Glykolyse wurde oftmals untersucht (27, 28, 29, 79, 80, 88, 94). Aufgrund dieser Untersuchungen kann gesagt werden, daß das Ausmaß der Glykolyse in erster Linie vom Hexokinase - Phosphofructokinase - System bestimmt wird (61).

Die Hexokinase ist ein regulierbares Enzym, sie wird durch ihr eigenes Produkt, dem Glucose-6-phosphat und des weiteren durch oxidiertes Glutathion inhibiert (34, 39, 81, 92, 103). Dem hemmenden Einfluß des oxidierten Glutathion auf die Hexokinase entgeht die Zelle durch dessen Reduktion in der Glutathion - Reduktase - Reaktion.

Die Phosphofructokinase (PFK) wird von zahlreichen Effektoren beeinflusst (51, 52). Dabei kommt dem pH-Wert eine zentrale Bedeutung zu. Untersuchungen an Rattenerythrocyten (72) zeigten, daß die PFK vom ATP mit fallendem pH-Wert gehemmt wird. Umgekehrt nimmt die F-6-P-Affinität des Enzyms mit steigendem pH-Wert zu. Dadurch wird ein multiplikativer Effekt hervorgerufen. Die PFK zeigt ähnlich der Hexokinase ihr Aktivitätsmaximum im alkalischen Bereich (94).

Positiv wird der Umsatz der Glucose in der Glykolyse auch über steigende Phosphatkonzentrationen bestimmt. Die Glykolyse läßt sich oberhalb pH 7,0 durch hohe Phosphatkonzentrationen auf mehr als das Doppelte erhöhen (61). Die gesteigerte Glykolyserate wird mit dem

Wegfall der allosterischen Hemmung der PFK durch ATP erklärt (23).

Neben den aufgeführten Faktoren spielen hormonelle Regulationseinflüsse auf den Glucoseumsatz eine Rolle.. Gesichert ist die stimulierende Wirkung von Adrenalin auf die Glykolyse (26).

Widersprüchliche Ansichten findet man in der Literatur über den Einfluß der Schilddrüsenhormone auf die Glykolyse. CALESNICK ET AL. (30) fanden bei Kaninchenerythrocyten 24 Stunden nach Applikation von L-Trijodthyronin eine Beschleunigung des Glucoseabbaus. Wurden die Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt, ließ sich dagegen ein verzögerter Glucoseabbau beobachten. CREVASSE ET AL. (35) hingegen konnten keine Beeinflussung der Glykolyse beobachten.

Dem Insulin wird bei der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels beim Erythrocyten, ähnlich wie bei den Nieren und der intestinalen Mucosa (130), faktisch keine Bedeutung beigemessen.

Eine Besonderheit des Erythrocyten stellt die 2,3-DPG-Bildung dar; GREENWALD (48) entdeckte diese Substanz 1925 im Erythrocyten des Schweines und des Menschen. Es zeigte sich, daß die Konzentration dieses Metaboliten bei Säugetieren recht unterschiedlich ist. Es werden 2,3-DPG-Konzentrationen zwischen 4 - 13 mmol/l gefunden (7, 97, 116).

RAPOPORT und LUEBERING (98, 99,100) und RAPOPORT und NIERADT (101) konnten am Kaninchenerythrocyten erstmals zeigen, daß 2,3-DPG in einem Nebenweg der Glykolyse gebildet wird. Hierbei wird, statt in der Phosphoglycerat - Kinase - Reaktion ATP zu bilden, 1,3-Diphosphoglycerat durch eine Mutase irreversibel in 2,3-Diphosphoglycerat umgewandelt, welches in der 2,3-DPG - Phosphatase - Reaktion in 3-Phosphoglycerat und anorganisches Phosphat gespalten und wieder in den Stoffwechselweg der Glykolyse eingeschleust werden kann.

CHANUTIN und CURNISH (33) und BENESCH und BENESCH (10, 11) stellten eine Interaktion von 2,3-DPG mit dem Hämoglobin des humanen Erythrocyten fest und bemerkten unter dem Einfluß von 2,3-DPG eine Abnahme der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins. In der Regulation der Sauerstoffaffinität wird dem 2,3-DPG von OSKI und GOTTLIEB (85) eine wichtige Funktion zugeschrieben; dies wurde von anderen Untersuchern bestätigt (6, 11, 40).

Ein weiterer für den Erythrocyten relevanter Stoffwechselweg der Glucose ist der Pentose - Phosphat-Zyklus (PPZ). Über diesen Reaktionsweg erfolgt eine direkte Oxidation auf der Stufe des Glucose-6-phosphates. Glucose-6-phosphat wird durch Dehydrierung von Aldehyd zur Säure umgewandelt. Anschließend erfolgt durch Decarboxylierung die Bildung von Pentose-5-phosphat.

Wie die Glykolyse verläuft auch der PPZ pH-abhängig (102). Als pH-abhängige Schrittmacherenzyme des PPZ gelten die

beiden NADP-abhängigen Enzyme Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Gluconsäure-5-phosphat-Dehydrogenase (24,25,59) Der dabei entstehende Wasserstoff wird auf NADP übertragen, wodurch Reduktionsäquivalente in Form des NADPH geschaffen werden. NADPH wird in der Glutathion - Reduktase - Reaktion benötigt; die Bedeutung des reduzierten Glutathions für die Zelle wurde bereits beschrieben.

Über den Pentosephosphatweg können der Zelle Pentosen bereitgestellt werden. KIM und ISAACKS (68) sind der Meinung, daß beim Säugetiererythrocyten Ribose als Stoffwechselsubstrat unter in-vivo-Verhältnissen wegen der extrem niedrigen Ribosekonzentration im Plasma unbedeutend ist. Eine Besonderheit zeigt der Schweineerythrocyt, der für Glucose fast impermeabel ist; er deckt seinen Energiebedarf im wesentlichen über Nucleoside (65, 66, 67, 135).

1.2. Der kernhaltige Erythrocyt

Bekanntlich sind die Erythrocyten der Fische wie die der Mehrzahl der Vertebraten durch das Vorhandensein eines Zellkerns charakterisiert.

Über den Stoffwechsel kernhaltiger Erythrocyten ist noch am meisten vom aviären Erythrocyten bekannt (31, 32, 38, 112). Nach dem derzeitigen Kenntnisstand kann davon ausgegangen werden, daß im ausgereiften kernhaltigen Erythrocyten die Synthese von RNS und Protein von untergeordneter Bedeutung ist. Die enzymatische Ausrüstung hierzu ist aber vorhanden. Die notwendige Riboseproduktion erfolgt über den PPZ.

Nach Untersuchungen an roten Blutzellen beim Hühnerembryo und frisch geschlüpften Küken hat man Anhaltspunkte dafür, daß beim kernhaltigen Erythrocyten eine periphere Erythropoese möglich ist (50).

SMITH und ENGELBERT (1966) beschrieben sog. Klonzellen, die aus Kernknospen junger reifer Erythrocyten entstehen; in diesen Zellen erfolgt vor und nach Abtrennung von der Mutterzelle neben weiteren Differenzierungsvorgängen auch die Hämoglobinsynthese. Diese Zellen sollen mit 3,7 - 6,8 % an der totalen Erythrocytenpopulation frisch geschlüpfter Küken beteiligt sein.

Ein ähnlicher Vorgang wird auch von W. TOPF (120) beschrieben; danach treten insbesondere bei jungen Karpfen im strömenden Blut als Erythroblasten angesprochene rote Blutzellen auf, die abgesehen von anderen morpho-

logischen Unterschieden, im Vergleich zu reifen Erythrocyten noch nicht vollständig mit Hämoglobin beladen sind.

Aus diesen Befunden geht letzten Endes hervor, daß der kernhaltige Erythrocyt im Prinzip durchaus zu größeren Syntheseleistungen fähig ist, auch wenn noch zu klären ist, ob sich diese Aussage verallgemeinern läßt.

Bedeutungsvoll für den kernhaltigen Erythrocyten ist neben dem Vorhandensein eines Zellkerns auch die Präsenz von Mitochondrien. Damit verfügt der kernhaltige Erythrocyt über die Möglichkeit neben der Glykolyse auch über den mitochondrialen Stoffwechsel energiereiche Verbindungen aufzubauen.

Früheren Untersuchungen zufolge weisen die Vogelerythrocyten sowohl die Metaboliten wie auch die Enzyme des Citratzyklus auf (37,106). Diese Untersuchungen sprechen für einen funktionsfähigen Citratzyklus. Es sei jedoch bemerkt, daß der O_2 -Verbrauch im Vergleich zu anderen somatischen Zellen gering ist (16,116). Dieses Verhalten resultiert aus der Tatsache, daß der Vogelerythrocyt über eine wesentlich kleinere Zahl von Mitochondrien verfügt; auch ist die Form der Cristae nicht besonders ausgeprägt.

Für die Modulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobinemoleküls, welche u. a. von der Konzentration bestimmter organischer Phosphatverbindungen abhängt, ist ein erheblicher Energieaufwand erforderlich. Dabei

spielt, wie erwähnt, bei den Mammaliern vor allem das 2,3-DPG eine große Rolle. Das scheint beim kernhaltigen Erythrocyten nicht der Fall zu sein. Eine Ausnahme bildet der embryonale Vogel, bei dem 2,3-DPG im Erythrocyten nachgewiesen wurde (9, 22, 59, 60).

Die Regulation der O_2 -Bindung an das Hämoglobin soll beim Vogel von IPP und ATP übernommen werden (7, 9, 59, 84). Die vorliegenden Untersuchungen am Fischerythrocyten lassen den Schluß zu, daß ATP (5, 44, 45, 46, 47, 83, 91, 97, 126, 127, 132) und GTP (43, 86) die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins regeln. Beim Aal sowie beim Karpfen scheint diesbezüglich GTP zu dominieren (64, 89, 124, 125). Auch IPP ist hinsichtlich der Sauerstoffaffinität von Bedeutung (59). Die Konzentrationen von ATP liegen bei den Fischerythrocyten bei 1 - 21 $\mu\text{mol/ml}$ Erythrocyten, die Konzentrationen von GTP bei 0,1 - 17 $\mu\text{mol/ml}$ Erythrocyten. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß Luftatmer kein spezielles Verteilungsmuster organischer Phosphate im Vergleich zu Kiemenatmern aufweisen (9).

Da der Fisch, anders als Lebewesen, die ihren Sauerstoffbedarf aus der Atmosphäre decken, unterschiedlichen O_2 -Konzentrationen ausgesetzt ist, erfordert dies eine besondere Anpassungsfähigkeit. FREY und BLACK (41) stellten bei verschiedenen Fischarten fest, daß ein erhöhter Kohlendioxidgehalt des Wassers die Erstickungsgrenze für Fische heraufsetzt; dies wird dadurch erreicht, daß unter dem Einfluß von CO_2 die O_2 -Affinität des Fischhämoglobins herabgesetzt wird (58).

Die Regulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins über energiereiche Phosphate stellt einen energetisch aufwendigen Mechanismus dar. Woher der kernhaltige Erythrocyt Energie bezieht, ist nicht hinreichend geklärt. Beim Vogel wurde bezweifelt, ob die Energie über die Glykolyse bereitgestellt wird. Untersuchungen an aviären Erythrocyten durch BELL (7,8,9) gaben keine Hinweise auf eine glykolytische Aktivität; weder konnte eine Abnahme der Glucosekonzentration bei der Inkubation von isolierten Erythrocyten festgestellt werden, noch wurde ein Ansteigen des Lactatspiegels beobachtet. Neuere Untersuchungen konnten aber eindeutig zeigen, daß Glucose umgesetzt wird (90). Gleichzeitig wurde gezeigt, daß der ATP-Spiegel maßgeblich über die Atmung aufrechterhalten wird. Eine Hemmung der mitochondrialen Atmung führte zu einem starken ATP-Abfall, der von der Glykolyse nicht regeneriert wurde.

Auffallend beim aviären Erythrocyten ist die geringe Glucosepermeabilität (70, 121, 134) im Vergleich zum Säugetiererythrocyten.

Inwieweit Erythrocyten des Fisches Glucose bzw. andere Kohlenhydrate verstoffwechseln, ist nicht bekannt.

KIM und ISAACKS (68) und BOLIS und LULY (20,21) untersuchten die Glucosepermeabilität beim Fischerythrocyten. Beim Elektrischen Aal (*Electrophorus electricus*) und beim Lungenfisch (*Lepidosiren paradoxa*) konnte eine mit dem menschlichen Erythrocyten vergleichbare Glucosepermeabilität festgestellt werden. Es wurden $1,2 \mu\text{mol}$ Glucose pro ml Zellen und einer Inkubationsdauer von 30 Minuten umgesetzt.

Dagegen sind die roten Blutzellen des Arawana (*Osteoglossum bicirrhosum*) nur wenig für Glucose permeabel ($0,2 \mu\text{mol}$ Glucose pro ml Zellen und 30 Minuten), die des Armored catfish (*Pterygoplichthys*) und des Pirarucu (*Arapaima gigas*) völlig impermeabel. Für den Mechanismus einer erleichterten Diffusion ergibt sich in keinem Fall ein Anhalt. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß für Ribose eine deutlich ausgeprägte Aufnahmebereitschaft bei allen untersuchten Amazonasfischen besteht (68). Der Erythrocyt des *Salmo trutta* L. zeigt für Ribose deutliche Permeabilität, für Glucose ist er dagegen impermeabel (20, 21).

Es fällt auf, daß beim Fisch besonders extreme Erscheinungsformen auftreten. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang die arktischen Weißblutfische (*Channichthyidae*), die als einzige unter den Vertebraten weder Erythrocyten noch Hämoglobin besitzen. Die Sauerstofftransportfunktion des Blutes dieser Fische kann durch Vergrößerung der Gefäßdurchmesser, des Blutvolumens und des Herzens sowie des 3 - 4-fach gesteigerten Herzminutenvolumens aufrechterhalten werden. Jedoch sollen 63 % des gelösten O_2 des Blutes bereits in Ruhe in Anspruch genommen werden; bei Fischen mit rotem Blut wird ein Wert von 25 % angenommen (87, 108).

Bei bestimmten Fischen besteht in Anpassung an sauerstoffarme Gewässer die Möglichkeit der Luftatmung (53). Darüberhinaus haben einige Fische die Fähigkeit entwickelt, anaerobe Zustände sehr lange auszuhalten. So ist vom Schlankbärbling (*Rasbora daniconius*) bekannt, daß er unter anaeroben Bedingungen mehr als 100 Tage

leben kann. Auch der Goldfisch (*Carassius auratus*) zeigt eine ausgeprägte Anpassungsfähigkeit an zeitweilige anaerobe Verhältnisse (53).

1.3. Zielsetzung

Während umfangreiche Arbeiten über den kernlosen Erythrocyten vorliegen, nicht zuletzt auch wegen seiner Bedeutung für den Menschen, wurde dem kernhaltigen Erythrocyten bisher weit weniger Aufmerksamkeit gewidmet.

Insbesondere die Frage, welche Substanzen der kernhaltige Erythrocyt metabolisiert, ist noch weitgehend offen. Der Bedeutung der Glucose im Stoffwechsel des aviären Erythrocyten wurde bereits in verschiedenen Arbeiten nachgegangen, beim Fischerythrocyten liegen jedoch fast keine Untersuchungen über den Glucosestoffwechsel vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Frage untersucht, inwieweit die Erythrocyten von Forellen (*Salmo gairdneri* Rich.) und Karpfen (*Cyprinus carpio* L.) zur Glykolyse fähig sind, bzw. zur Glykolyse stimuliert werden können.

Im weiteren interessierte dann, in welchem Umfang der mitochondriale Stoffwechsel an der Energiebereitstellung des Erythrocyten beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde auch untersucht, inwieweit eine Beziehung zwischen mitochondrialem Stoffwechsel und der Glykolyse besteht.

2. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

2.1. Material und Methoden

2.1.1. Reagenzien

Die benötigten Reagenzien und die Herstellerfirmen sind im folgenden aufgeführt:

Enzyme, Coenzyme:	Fa. Böhringer, Mannheim
Heparin (Liquemin ^R):	Hoffmann - La Roche AG, Grenzach - Whylen
U- ¹⁴ C-Glucose,	
U- ¹⁴ C-Lactat:	Fa. Ammersham Buchler, Braunschweig
Substrate und alle übrigen Reagenzien:	Fa. E. Merck AG, Darmstadt

Zur Herstellung der Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben, aqua bidest. verwendet.

2.1.2. Versuchstiere und Haltung

Zur Untersuchung gelangten Karpfen (*Cyprinus carpio*) und Regenbogenforellen (*Salmo gairdneri* R.). Die Versuchstiere wurden von der Fa. Pförtner in Moos bei München bezogen sowie von der Versuchsanlage der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung in Wielenbach.

Bei den Regenbogenforellen handelte es sich um etwa drei Jahre alte (dreisömmrige) Fische mit einem Durchschnittsgewicht von 390 - 400 g und einer Körperlänge von 33 - 42 cm.

Die verwendeten Karpfen waren etwa drei Jahre alt (K_3), das Durchschnittsgewicht lag bei 840 - 1350 g, die Körperlänge zwischen 36 - 44 cm.

Es wurde darauf geachtet, daß die Tiere gesund und parasitenfrei waren. Auf das Geschlecht wurde nicht geachtet. Die Tiere wurden während des ganzen Jahres zur Untersuchung herangezogen.

Die Hälterung erfolgte in einem 500 l Kunststoffbecken bei natürlicher Beleuchtung. Das Becken wurde mit etwa 5 l frischem Leitungswasser pro Minute durchströmt, zusätzlich wurde eine Diffusorbelüftung der Fa. Wisa installiert.

Da eine Schädigung der Versuchstiere durch gelegentlich im Leitungswasser auftretende Chlorung ausgeschlossen werden sollte, wurde das Chlor durch einen Aktivkohlefilter abgefangen.

Die Wassertemperatur lag in einem Bereich zwischen 11,5 - 13,5 °C, der Sauerstoffgehalt des Wassers unterschritt 9,5 ppm nicht.

Die Tiere wurden täglich mit handelsüblichem Alleinfutter ad libitum gefüttert.

Die Untersuchungen erfolgten nach einer 4 - 5-tägigen Akklimatisationsphase, um größere, durch Hypoxie während des Transportes der Fische ausgelöste Schwankungen der Erythrocytenzahl zu vermeiden (111) und um Einflüsse von Temperaturschwankungen und Streß auf das Stoffwechselgeschehen zu mildern (5).

Mit dem Ziel einer guten Vergleichsmöglichkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden Forellen und Karpfen gemeinsam gehältert und gelangten auch jeweils gemeinsam zur Untersuchung..

2.1.3. Blutuntersuchungen

2.1.3.1. Gewinnung der Erythrocyten

Zur Blutentnahme aus der Schwanzvene wurden die Tiere durch Kopfschlag betäubt. Diese Technik wurde gewählt, um Einflüsse sonst gebräuchlicher Narkotika auf physiologische Parameter zu vermeiden. Durch Zerplatzen der Schädelgefäße herbeigeführte Blutverluste waren im Hinblick auf die zu untersuchenden Parameter ohne Belang. Die Tiere wurden möglichst vollständig entblutet. Die Gerinnung des Blutes wurde durch Zugabe einer Heparinlösung (Liquemin^R) verhindert.

Zur Gewinnung der Erythrocytensuspension wurde das Blut umgehend einem Waschvorgang unterzogen. Dazu wurde das Blut mit Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) mod. n. Wolf (131) im Verhältnis 1 : 3 verdünnt und anschließend 4 Minuten bei 1000 g zentrifugiert (Modell II, IBR).

Der wässrige Überstand wurde zusammen mit dem Leukocyten- saum durch Aspiration entfernt. Der Vorgang wurde zur einwandfreien Gewinnung der Erythrocyten noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Erythrocytensediment in einem Krebs-Henseleit-Puffer (pH 7,4) mod. n. Wolf suspendiert. Die Menge des zugesetzten Puffers entsprach dem ursprünglich eingesetzten Blutvolumen, wodurch sich der Hämatokrit in gewünschter Weise verringerte.

Es sollte sichergestellt werden, daß die glykolytische Aktivität der Leukocyten die Meßergebnisse nicht beeinflußt. Daher wurden zur Kontrolle Blutaussstriche angefertigt. Leukocyten waren nur vereinzelt zu beobachten.

2.1.3.2. Untersuchungen im Vollblut

a) Hämatokrit

Die Hämatokritbestimmung wurde unter Verwendung der Methode nach STRUMIA (119) durchgeführt.

b) Hämoglobin

Die Bestimmung der Hämoglobinkonzentration erfolgte nach BETKE und SAVELSBERG (18). Sie basiert auf der Überführung von Oxy-Hämoglobin in Cyanhämatin, dessen Extinktion bei 540 nm photometrisch bestimmt wird.

c) D-Glucose

Die Bestimmung der D-Glucosekonzentration erfolgte nach der Methode von BERGMAYER ET AL. (15).

d) L-Lactat

Die L-Lactatkonzentration wurde enzymatisch nach der Methode von HOHORST (54) bestimmt.

2.1.3.3. Inkubation

Die in der beschriebenen Weise hergestellte Erythrocytensuspension wurde sofort zu je 1 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße übergeführt und bei 25 °C in einem Schüttelbad (Köttermann) 60 Minuten inkubiert.

Folgende Substanzen wurden in den angegebenen Konzentrationen im Ansatz verwendet:

Glucose	:	10 mmol
Ribose	:	10 mmol
Adenin	:	10 mmol
Adenosin	:	10 mmol
Inosin	:	10 mmol
Pyruvat	:	10 mmol
Lactat	:	10 mmol
Antimycin A	:	1 mmol
2,4-Dinitrophenol	:	1 mmol
Kaliumcyanid	:	1 mmol
Natriumfluorid	:	1 mmol
Methylenblau	:	1 mmol

Antimycin A wurde in einer 1 %-igen Alkohollösung in Lösung gebracht. Um durch den Zusatz von Alkohol bedingte Veränderungen der gemessenen Parameter erfassen zu können, wurden Kontrollansätze mitgeführt, denen in gleicher Weise und Menge lediglich die Alkohollösung zugefügt wurde.

Die Purinderivate Adenosin, Adenin und Inosin wurden in alkalisiertem Milieu (NaOH, 0,1 m) zur Lösung gebracht, anschließend erfolgte die Einstellung der Lösungen, wie in den oben aufgeführten Ansätzen üblich, auf pH 7,4.

2.1.3.4. Metabolitenbestimmung

Die Inkubationsmischungen wurden in der Regel nach 60 Minuten zur Metabolitbestimmung mit 30 %-iger TCE oder 30 %-iger HClO_4 enteivest. Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde jeweils 1 Inkubationsansatz gestoppt.

Es folgte eine 5-minütige Lagerung der Proben bei Zimmertemperatur unter Schütteln, um eine vollständige Enteivestung zu erreichen. Nach anschließender 5-minütiger Lagerung in einem Eisbad wurden die Proben in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Modell 3200) 2 Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert.

Der Überstand der enteivesteten Proben wurde in neue Eppendorfgefäße pipettiert, die Gefäße bis zur alsbaldigen Bestimmung der Metaboliten erneut in ein Eisbad verbracht.

Es wurden folgende Metaboliten bestimmt:

- a) D-Glucose: Bestimmung nach BERGMAYER ET AL. (15)
- b) L-Lactat: Bestimmung nach HOHORST (54)
- c) 2,3-DPG: Bestimmung nach KRIMSKY (71)
- d) Pyruvat: Bestimmung nach CZOK und LAMPRECHT (36)
- e) ATP: Bestimmung nach JAWOREK ET AL. (62)
- f) ADP, AMP: Bestimmung nach JAWOREK ET AL. (63)
- g) Malat: Bestimmung nach HOHORST (55)

Versuche mit U-¹⁴C-Glucose:

Zunächst wurde versucht die Glucose von eventuell gebildeten Metaboliten abzutrennen. Diese Versuche wurden mit einer Probelösung durchgeführt, die 9 µCi/ml Glucose sowie Lactat gleicher Aktivität enthielt.

Versuche, eine Auftrennung im Anionenaustauscher vorzunehmen, führten nicht zu einer deutlichen Trennung. In befriedigender Weise konnte dagegen eine Auftrennung der beiden hauptsächlich interessierenden Metaboliten Glucose und Lactat mittels Elektrophorese erreicht werden (Abb.S. 31).

Dazu wurde eine Elektrophoresekammer (Dr. Bender und Dr. Hobein) verwendet, die mit einer 0,25-molaren

Saccharoselösung (pH 11) beschickt wurde. Das zu trennende Substanzgemisch wurde auf die in der Saccharoselösung angefeuchteten Elektrophoresestreifen an markierter Stelle strichförmig aufgetragen. Die Lage der Startlinie wurde entsprechend der zu erwartenden Wanderungsrichtung des Lactats auf der Seite der Kathode der Kammer gewählt. Die Klemmenspannung betrug 195 V. Zur Kontrolle der vollständigen Abtrennung des Gemisches wurde jeweils ein Glucose-Lactat-Gemisch verwendet. Dabei wandert das negativ geladene Lactat zur Anode, das Glucosemolekül bleibt dagegen in der Nähe der Auftragsstelle liegen. Nach 45 Minuten wurde der Trennvorgang beendet; die Zonen sind durch das Trägermedium fixiert. Anschließend wurde der Streifen getrocknet und die entstehenden Peaks im Scanner (Dünnschicht-Scanner, Fa. Berthold, Wildbad) unter folgenden Bedingungen registriert:

Spaltbreite: 4 mm

Suchgeschwindigkeit: 1200 mm/h

Empfindlichkeit: 10

Trägheit: 3 sec

Zur Bestimmung von eventuell gebildeten Metaboliten, die sich über die Glykolyse bilden, wurde die Erythrocyten-suspension nach der Inkubation enteiweißt (HClO_4 , vgl. S. 20), 10 Minuten bei $10.000 \times g$ zentrifugiert und $25 \mu\text{l}$ des dekantierten Überstands für die Auftrennung in der Elektrophoresekammer verwendet. Zum Vergleich wurde eine Kontrollösung herangezogen, die ^{14}C -markierte Glucose und Lactat enthielt.

2.1.3.5. Enzyme

Die Aktivität der HK, der PK, der LDH und der G-6-P-DH wurde im Überstand bestimmt

- a) Hexokinase: Bestimmung nach BERGMEYER (13)
- b) Pyruvatkinase: Bestimmung nach GUTMANN und BERNT (49)
- c) Lactatdehydrogenase: Bestimmung nach BERGMEYER und BERNT (14)
- d) Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase: Bestimmung nach LÜHR und WALLER (74)

2.1.3.6. Messung des O₂-Verbrauches

Der Sauerstoffverbrauch der Erythrocyten wurde in der Warburg-Apparatur bestimmt.

2.1.4. Statistische Berechnung

Die Werte, die in den Tabellen und Abbildungen angegeben sind, stellen Mittelwerte ($\bar{x}$) mit den entsprechenden Standardabweichungen ($\pm s$) dar. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des t-Tests berechnet (109).

2.2. Ergebnisse

Es stellte sich die Frage, ob die beiden untersuchten Spezies Karpfen und Forelle von vornherein unterschiedliche Blutparameter aufweisen. Deshalb wurden einige für die Untersuchung relevante Parameter bestimmt (Tab. 1). Dabei zeigte sich, daß signifikante Unterschiede nur im Serumlactatgehalt auftreten. Das Forellenblut weist höhere Anteile auf.

In anschließenden Untersuchungen wurde der Sauerstoffverbrauch der Erythrocyten beider Fischarten in der Warburg - Apparatur bestimmt. Dabei zeigte der Forellenerythrocyt die Tendenz, weniger Sauerstoff zu verbrauchen; dies ließ sich jedoch statistisch nicht absichern (Tab. 2,3).

Die Inkubation der Erythrocytensuspensionen mit Glucose (10 mmol/l) zeigte keine Auswirkung auf den O_2 -Verbrauch. Dagegen konnte der Sauerstoffverbrauch durch KCN (1 mmol/l), einem Hemmstoff der Atmung, deutlich gesenkt werden. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß der Sauerstoffverbrauch der Erythrocyten mit höheren Temperaturen ansteigt (Tab. 2,3).

Wegen des auffälligen Unterschieds in der Lactatkonzentration im Serum interessierte schließlich die Frage, ob auch der Lactatgehalt der Erythrocyten beider Spezies differiert. Es ließ sich aber kein signifikanter Unterschied feststellen (Tab. 4). Darüber hinaus wurde auch noch Pyruvat und Malat bestimmt. Auch hier zeigte sich kein Unterschied zwischen Karpfen und Forelle. Glucose konnte auch nach starker Anreicherung der Erythrocyten

Tab. 1: Blutparameter beim Karpfen und bei der Forelle

	Karpfen	Forelle
Blutzucker	mmol/l $2,1 \pm 0,4$ (8)	$2,1 \pm 0,4$ (8)
Lactat	mmol/l $0,4 \pm 0,04$ (8)	$0,6 \pm 0,10$ (8) **
Erythrocytenzahl	$1 \times 10^6 / \mu\text{l}$ $1,5 \pm 0,3$ (8)	$1,6 \pm 0,4$ (6)
Hämatokrit	% $25,0 \pm 6,0$ (158)	$30,0 \pm 6,0$ (162)
Hämoglobingehalt	g/dl $12,5 \pm 1,9$ (6)	$13,0 \pm 2,2$ (6)

Die Anzahl der Proben ist in Klammern angegeben.

** $p < 0,01$

Tab. 2: Der Sauerstoffverbrauch der Erythrocyten (1 ml) vom Karpfen bei unterschiedlicher Temperatur und unter dem Einfluß von Glucose (10 mmol/l) und KCN (1 mmol/l)

Karpfen	15 min	30 min	45 min	60 min
	$\mu\text{l O}_2 / \text{ml Erythrocyten}$			
15 °C	$61,2 \pm 18,2$ (6)	$92,7 \pm 15,9$ (6)	$108,1 \pm 21,3$ (6)	$162,0 \pm 17,4$ (6)
25 °C	$60,6 \pm 16,4$ (30)	$106,8 \pm 16,8$ (30)	$146,3 \pm 12,4$ (30)	$190,7 \pm 10,0$ (30)
30 °C	$81,9 \pm 18,8$ (7)	$128,6 \pm 42,1$ (7)	$206,8 \pm 36,7$ (7)	$251,8 \pm 34,2$ (7)
25 °C + Glucose (10 mmol/l)	$64,3 \pm 14,6$ (12)	$96,4 \pm 17,2$ (12)	$149,0 \pm 13,1$ (12)	$188,8 \pm 23,1$ (12)
25 °C + KCN (1 mmol/l)	$8,9 \pm 2,3$ (7)	$20,1 \pm 4,3$ (7)	$24,6 \pm 6,1$ (7)	$28,7 \pm 3,1$ (7)

Tab. 3: Der Sauerstoffverbrauch der Erythrocyten (1 ml) von der Forelle bei unterschiedlicher Temperatur und unter dem Einfluß von Glucose (10 mmol/l) und KCN (1 mmol/l)

Forelle	15 min	30 min	45 min	60 min
	$\mu\text{l O}_2 / \text{ml Erythrocyten}$			
15 °C	41,7 $\pm$ 8,2 (7)	69,3 $\pm$ 9,5 (7)	92,9 $\pm$ 12,3 (7)	115,4 $\pm$ 22,1 (7)
25 °C	62,8 $\pm$ 12,1 (30)	95,1 $\pm$ 19,8 (30)	105,1 $\pm$ 9,91 (30)	145,1 $\pm$ 22,4 (30)
30 °C	73,6 $\pm$ 12,8 (7)	108,9 $\pm$ 18,8 (7)	118,9 $\pm$ 22,1 (7)	227,6 $\pm$ 33,2 (7)
25 °C + Glucose (10 mmol/l)	64,3 $\pm$ 13,1 (7)	93,4 $\pm$ 21,1 (7)	112,0 $\pm$ 31,1 (7)	139,8 $\pm$ 22,9 (7)
25 °C + KCN (1 mmol/l)	6,2 $\pm$ 1,5 (8)	12,4 $\pm$ 2,2 (8)	22,2 $\pm$ 4,8 (8)	23,9 $\pm$ 2,4 (8)

Tab. 4: Die Konzentration von Glucose, Lactat, Pyruvat
und Malat in Karpfen- und Forellenerythrocyten

	Karpfen	Forelle
	$\mu\text{mol/ml}$	
Glucose	nicht meßbar	nicht meßbar
Lactat	$2,76 \pm 0,61$ (10)	$2,83 \pm 0,61$ (14)
Pyruvat	$0,46 \pm 0,06$ (9)	$0,51 \pm 0,05$ (9)
Malat	$1,04 \pm 0,24$ (8)	$0,89 \pm 0,14$ (10)

auf ca. 70 Vol.% nicht nachgewiesen werden.

Nun interessierte, ob die Erythrocyten Glucose umsetzen. Zu diesem Zweck wurden Erythrocytensuspensionen vorbereitet, die teils mit Glucose und teils ohne Glucose inkubiert wurden. Als Kontrolle dienten Ansätze, die durch Zusatz von HClO_4 sofort gestoppt wurden. Die übrigen Ansätze wurden 60 bzw. 120 Minuten inkubiert und anschließend die Metaboliten Glucose, Lactat und Pyruvat, wie im Teil Methodik beschrieben, bestimmt.

Die Glucosekonzentration blieb während der Inkubation annähernd konstant. Die Lactatkonzentration erhöhte sich während der Inkubation geringfügig, die Pyruvatkonzentration hingegen deutlich. Die Zugabe von Glucose hatte darauf keinen Einfluß. Außerdem konnte bei Inkubation mit U-^{14} -Glucose keine Neubildung von radioaktiven Metaboliten bemerkt werden (Abb. 3, 4).

In nachfolgenden Untersuchungen wurde untersucht, ob NaF, das bekanntlich hemmend auf die Glykolyse wirkt, einen Einfluß auf den Verlauf der Metaboliten hat. Dabei zeigten sich keine Veränderungen der Glucosekonzentration der Proben. Ferner wurden die Produkte der Glykolyse Pyruvat und Lactat bestimmt. Die Lactatkonzentration NaF-inkubierter Zellen erhöhte sich unabhängig von der Glucose. Wie Tabelle 6 zu entnehmen ist, hatte NaF keine Auswirkungen auf die Konzentration der Metaboliten Lactat und Pyruvat.

Weitere Versuche sollten zeigen, ob auf Grund der enzy-

Tab. 5: Die Konzentration von Glucose, Lactat und Pyruvat in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle
 Inkubationstemperatur: 25 °C

Parameter	Glucose (10 mmol/l)	t = 0		t = 60 min		t = 120 min	
				μmol/ml			
Karpfen	Glucose	+	9,72 ± 0,34 (10)	9,72 ± 0,37 (10)	9,74 ± 0,33 (10)		
	Lactat	+		3,39 ± 0,64 (9)	3,55 ± 0,51 (9) [†]		
		-	2,89 ± 0,53 (9)	3,22 ± 0,44 (9)	3,46 ± 0,57 (9) [†]		
	Pyruvat	+		0,59 ± 0,08 (8) ^{††}			
Forelle		-	0,29 ± 0,05 (7)	0,58 ± 0,06 (7) ^{††}			
	Glucose	+	9,83 ± 0,33 (11)	9,80 ± 0,35 (11)	9,67 ± 0,37 (11)		
	Lactat	+		3,26 ± 0,52 (7)	3,58 ± 0,43 (7) [†]		
		-	2,93 ± 0,44 (7)	3,32 ± 0,52 (7)	3,49 ± 0,39 (7) [†]		
Pyruvat		+		0,53 ± 0,05 (7) ^{††}			
		-	0,32 ± 0,08 (7)	0,52 ± 0,06 (7) ^{††}			

[†] p < 0,05, ^{††} p < 0,01

Abb. 2: Die elektrophoretische Auftrennung eines
Glucose - Lactat - Gemisches



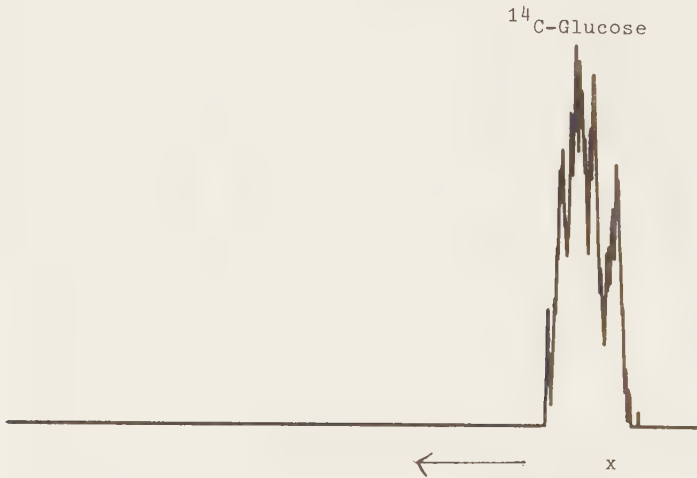
x = Auftragspunkt

Abb. 3: Die elektrophoretische Auftrennung der Erythro-
cytensuspension vom Karpfen nach Inkubation mit
 $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glucose



x = Auftragspunkt

Abb. 4: Die elektrophoretische Auftrennung der Erythrocytensuspension von der Forelle nach Inkubation mit U- 14 C-Glucose



x = Auftragspunkt

Tab. 6: Die Konzentration von Glucose, Lactat und Pyruvat in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle unter dem Einfluß von NaF
 Inkubationstemperatur: 25 °C

Parameter		NaF (1 mmol/l)	Glucose (10 mmol/l)	t = 0	t = 60 min
		µmol/ml			
Karpfen	Glucose	+	+	9,83 ± 0,54 (8)	9,32 ± 0,51 (8)
	Lactat	+	+		3,40 ± 0,44 (8)
		+	-		3,23 ± 0,53 (8)
		-	-	2,70 ± 0,41 (8)	3,11 ± 0,49 (8)
Forelle	Pyruvat	+	+		0,42 ± 0,06 (8)
		+	-		0,35 ± 0,04 (8)
		-	-	0,45 ± 0,05 (8)	0,56 ± 0,06 (8)
	Glucose	+	+	9,79 ± 0,49 (8)	9,80 ± 0,51 (8)
Forelle	Lactat	+	+	2,60 ± 0,52 (6)	3,12 ± 0,46 (6)
		+	-		2,89 ± 0,52 (6)
		-	-	2,72 ± 0,28 (6)	3,01 ± 0,46 (6)
	Pyruvat	+	+		0,45 ± 0,06 (6)
		+	-		0,38 ± 0,08 (6)
		-	-	0,51 ± 0,05 (6)	0,53 ± 0,09 (6)

matischen Ausstattung der Erythrocyten überhaupt eine Metabolisierung von Glucose möglich ist. Dazu wurden die in Tabelle 7 aufgeführten Enzymaktivitäten bestimmt. Auffällig ist die geringe Aktivität der Hexokinase im Erythrocyten von Karpfen und von der Forelle. Der Forellenerythrocyt weist bei der PFK eine im Vergleich zum Karpfen kleinere Aktivität auf, dagegen zeigt die PK der Forelle eine wesentlich größere Umsatzgeschwindigkeit. In Bezug auf die Aktivität der LDH ließen sich keine eindeutigen Unterschiede ermitteln. Weiterhin wurde die G-6-P-DH nachgewiesen, die ähnlich der HK in der Glykolyse die Durchsatzgeschwindigkeit der Glucose im Pentose-Phosphat-Zyklus reguliert.

Im folgenden wurde die Bildung von Lactat und Pyruvat unter Bedingungen, unter denen der mitochondriale Stoffwechsel ausgeschaltet wurde, untersucht. Zu diesem Zweck wurden Erythrocytensuspensionen einmal unter anaeroben Bedingungen (Begasung mit Stickstoff) und zum anderen mit Substanzen inkubiert, die die mitochondriale Atmung hemmen, wie z. B. KCN, Antimycin A und 2,4-DNP.

Es zeigte sich, daß sich im glucosefreien Medium unter anoxischen Bedingungen nur Lactat signifikant anreichert. In Anwesenheit von Glucose hingegen erhöhte sich sowohl die Lactat- wie auch die Pyruvatkonzentration (Tab. 8). Wurde die mitochondriale Atmung durch KCN gehemmt, so führte dies zu einem Anstieg der Lactat- und Pyruvatkonzentration. Diese Befunde gelten für den Karpfen und die Forelle. Glucose führte dann mit Ausnahme bei der Forelle (Lactat) zu einem weiteren Anstieg der Lactat-

und Pyruvatkonzentration. Wurde Antimycin A allein eingesetzt, so erhöhten sich nur beim Karpfen Lactat und Pyruvat. Die Zugabe von Antimycin A und Glucose führte sowohl beim Karpfen als auch bei der Forelle zu einer Steigerung der Lactatkonzentration (Tab. 9,10).

Ähnlich wie unter anoxischen Zuständen löste auch das 2,4-DNP einen Anstieg von Lactat aus, der in Anwesenheit von Glucose besonders deutlich ausgeprägt war (Tab. 9, 10).

Darüber hinaus wurde Methylenblau eingesetzt, das aufgrund seiner oxidierenden Kapazität in den Stoffwechsel eingreift. Die Auswirkungen dieser Substanz sind in den Tabellen 11 und 12 aufgeführt. Demnach kommt es unter Einwirkung von Methylenblau sowohl beim Karpfen wie auch bei der Forelle zu einem deutlichen Anstieg der Pyruvatkonzentration, wobei auch hier die Ansätze mit Glucose den höheren Anstieg zeigten. Auf die Lactatkonzentration war unter Methylenblau kein Effekt feststellbar.

Abschließend sollte untersucht werden, inwieweit Lactat und Pyruvat im Fischerythrocyten umgesetzt werden. Zu diesem Zweck wurden diese Substanzen der Erythrocytensuspension beigegeben und nach 60 Minuten Inkubation die Lactat- bzw. Pyruvatkonzentration bestimmt. Gleichzeitig wurde der Einfluß auf die Malatkonzentration untersucht, die in den Erythrocyten vom Karpfen und der Forelle einen relativ hohen Wert erreicht (Tab. 4).

Wurde Lactat dem Inkubationsmedium zugesetzt, so erniedrigte sich dessen Konzentration sowohl beim Karpfen wie auch bei der Forelle um ca. 40 % (Tab. 13). Gleichzeitig kam es in Gegenwart von Lactat zu einem ausgeprägten Anstieg der Pyruvat- und Malatkonzentration.

Wurde an Stelle von Lactat Pyruvat eingesetzt, so erniedrigte sich die Pyruvatkonzentration signifikant. Gleichzeitig verursachte die Zugabe von Pyruvat einen leichten nicht signifikanten Anstieg der Lactat- und Malatkonzentration (Tab. 14).

Tab. 7: Enzymaktivitäten in Erythrocytenhämolysaten vom Karpfen und von der Forelle

	Karpfen	Forelle
	$\mu\text{U/ml}$	
PFK	$768,2 \pm 84,5$ (3)	$258,6 \pm 60,8$ (4)
HK	$225,9 \pm 44,3$ (4)	$225,2 \pm 59,3$ (6)
PK	$507,9 \pm 105,2$ (4)	$2009,4 \pm 340,4$ (6)
LDH	$2046,8 \pm 322,2$ (6)	$1813,5 \pm 201,2$ (6)
G-6-PDH	$372,8 \pm 80,4$ (4)	$212,7 \pm 24,3$ (5)

Tab. 8: Der Einfluß der Anoxie (Begasung mit Stickstoff) auf die Lactat- und Pyruvatkonzentration in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle

	Karpfen		Forelle	
	Lactat	Pyruvat μmol/ml	Lactat	Pyruvat μmol/ml
Kontrolle t = 0	2,77 ± 0,28 (8)	0,49 ± 0,03 (8)	2,70 ± 0,27 (8)	0,51 ± 0,04 (8)
Kontrolle t = 60'	3,28 ± 0,35 (8)	0,55 ± 0,05 (8)	3,12 ± 0,37 (8)	0,57 ± 0,04 (8)
Begasung mit N ₂				
- Glucose				
(10 mmol/l)	4,22 ± 0,39 (8) [†]	0,59 ± 0,04 (8)	4,17 ± 0,25 (8) ^{††}	0,60 ± 0,04 (8)
Begasung mit N ₂				
+ Glucose				
(10 mmol/l)	4,91 ± 0,51 (8) ^{††}	0,77 ± 0,05 (8) ^{†††}	8,73 ± 0,52 (8) ^{†††}	1,54 ± 0,08 (8) ^{†††}

[†] p < 0,05, ^{††} p < 0,01, ^{†††} p < 0,001

Tab. 9: Der Einfluß von KCN, Antimycin A und 2,4-DNP auf die Lactat- und Pyruvatkonzentration in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen
 Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 Minuten

Karpfen

	Glucose (10 mmol/l)	Lactat	Parameter	
			µmol/ml	
-	-	3,05 ± 0,43 (14)	0,54 ± 0,07 (14)	-
KCN (1 mmol/l)	+	3,86 ± 0,53 (10)*	1,26 ± 0,12 (8)**	-
	+	4,85 ± 0,71 (10)***	2,42 ± 0,11 (8)***	-
Antimycin A (1 mmol/l)	-	3,87 ± 0,47 (10)*	0,67 ± 0,06 (8)*	-
	+	5,24 ± 0,63 (10)***	0,70 ± 0,05 (8)*	-
2,4-DNP (1 mmol/l)	-	4,06 ± 0,33 (8)**	0,59 ± 0,06 (8)	-
	+	5,71 ± 0,41 (8)***	1,04 ± 0,07 (8)***	-

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 10: Der Einfluß von KCN, Antimycin A und 2,4-DNP auf die Lactat- und Pyruvatkonzentration in Erythrocytensuspensionen von der Forelle

Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 Minuten

Forelle

	Glucose (10 mmol/l)	Parameter µmol/ml	
		Lactat	Pyruvat
-	-	3,16 ± 0,48 (10)	0,55 ± 0,05 (10)
KCN (1 mmol/l)	-	3,63 ± 0,37 (8)†	0,65 ± 0,03 (8)†
	+	3,53 ± 0,37 (10)†	0,92 ± 0,02 (10)††
Antimycin A (1 mmol/l)	-	3,67 ± 0,48 (8)	0,61 ± 0,16 (8)
	+	4,25 ± 0,55 (8)††	0,63 ± 0,06 (8)
2,4-DNP (1 mmol/l)	-	3,67 ± 0,13 (7)†	0,58 ± 0,07 (7)
	+	7,13 ± 0,78 (7)†††	1,03 ± 0,12 (7)†††

† p < 0,05, †† p < 0,01, ††† p < 0,001

Tab. 11: Die Konzentration von Glucose, Lactat und Pyruvat in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen unter dem Einfluß von Methylenblau

Karpfen

Parameter	Methylenblau (1 mmol/l)	Glucose (10 mmol/l)	t = 0	t = 60 min
			$\mu\text{mol/ml}$	
Glucose	+	+	$9,84 \pm 0,32$ (8)	$9,24 \pm 0,29$ (8)*
Lactat	+	-		$3,02 \pm 0,44$ (8)
	+	+		$3,54 \pm 0,24$ (8)
	-	-		$3,13 \pm 0,52$ (8)
Pyruvat	+	-		$1,14 \pm 0,11$ (8)**
	+	+		$1,37 \pm 0,07$ (8)**
	-	-		$0,56 \pm 0,07$ (8)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Tab. 12: Die Konzentration von Glucose, Lactat und Pyruvat in Erythrocytensuspensionen von der Forelle unter dem Einfluß von Methylenblau

Forelle

Parameter	Methylenblau (1 mmol/l)	Glucose (10 mmol/l)	t = 0	t = 60 min
				$\mu\text{mol/ml}$
Glucose	+	+	$9,78 \pm 0,22$ (8)	$9,04 \pm 0,24$ (8) [†]
Lactat	+	-		$3,05 \pm 0,39$ (8)
	+	+		$3,10 \pm 0,43$ (8)
	-	-		$3,01 \pm 0,44$ (8)
Pyruvat	+	-		$1,12 \pm 0,16$ (8) ^{††}
	+	+		$1,73 \pm 0,14$ (8) ^{†††}
	-	-		$0,53 \pm 0,09$ (8)

[†] $p < 0,05$, ^{††} $p < 0,01$, ^{†††} $p < 0,001$

Tab. 13: Die Metabolisierung von Lactat in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle

Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 Minuten

Parameter	Lactat (10 mmol/l)	Karpfen μmol/ml	Forelle μmol/ml
Lactat	t = 0	9,78 ± 0,45 (8)	9,81 ± 0,59 (8)
	t = 60'	6,02 ± 0,8 (8)***	6,01 ± 1,12 (8)***
Malat	t = 0	1,04 ± 0,24 (8)	0,89 ± 0,14 (8)
	t = 60'	0,95 ± 0,27 (8)	0,87 ± 0,18 (8)
	t = 60'	4,88 ± 0,64 (8)***	5,76 ± 0,55 (8)***
Pyruvat	t = 0	0,31 ± 0,06 (8)	0,32 ± 0,06 (8)
	t = 60'	1,55 ± 0,15 (8)***	1,66 ± 0,18 (8)***

*** p < 0,001

Tab. 14: Die Metabolisierung von Pyruvat in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle

Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 Minuten

Parameter	Pyruvat (10 mmol/l)	Karpfen μmol/ml	Forelle μmol/ml
Pyruvat	t = 0	9,75 ± 1,72 (7)	9,84 ± 0,18 (7)
	t = 60'	9,13 ± 0,24 (7) [†]	9,15 ± 0,28 (7) [†]
Lactat	t = 60'	3,85 ± 0,42 (7)	3,82 ± 0,45 (7)
	t = 60'	3,31 ± 0,18 (7)	3,03 ± 0,22 (7)
Malat	t = 60'	1,11 ± 0,27 (7)	1,08 ± 0,18 (7)
	t = 60'	0,89 ± 0,18 (7)	0,87 ± 0,21 (7)

[†] p < 0,05

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Bildung von ATP in Erythrocyten vom Karpfen und von der Forelle. Zunächst wurden die ATP-Gehalte der Erythrocyten beider Fischarten bestimmt. Wie Tabelle 15 zeigt, entspricht die ATP-Konzentration des Karpfenerythrocyten annähernd der des Forellenerythrocyten.

Im Verlauf der Inkubation verringerte sich sowohl beim Karpfen wie auch bei der Forelle die ATP-Konzentration. Die Zugabe von Glucose bzw. NaF hatte darauf keinen Einfluß (Tab. 15, 16).

Im folgenden wurde die Auswirkung von KCN, Antimycin A und 2,4-DNP auf den ATP-Spiegel untersucht. Alle drei eingesetzten Substanzen führten zu einem drastischen Abfall des ATP-Spiegels. Eine ähnliche Wirkung auf den ATP-Gehalt zeigte auch Methylenblau (Tab. 17).

Mit der Abnahme von ATP konnte gleichzeitig ein Anstieg von ADP und AMP beobachtet werden, wobei der Forellenerythrocyt eine besonders deutliche Anreicherung von AMP zeigte (Tab. 18, 19).

Addiert man die Nukleotide, die sich unter den einzelnen Untersuchungsbedingungen auffinden ließen, so fällt auf, daß sich die Summe dieser organischen Phosphate unter dem Einfluß von KCN, Antimycin A und 2,4-DNP erhöhte; besonders deutlich war dies bei der Forelle. Glucose blieb ohne Auswirkung auf den Nukleotidgehalt der Erythrocyten (Tab. 20).

Schließlich wurde der Einfluß der Anoxie auf die ATP-

Konzentration untersucht. Unter diesen Bedingungen veränderte sich beim Karpfen die ATP-Konzentration nur gering, beim Forellenerythrocyten wurde jedoch ein erheblicher Anstieg des ATP-Gehaltes festgestellt (Tab. 21).

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, verstoffwechseln Erythrocyten von Schwein und Geflügel Nukleoside. Abschließend sollte daher untersucht werden, ob dies auch für Fischerythrocyten gilt. Zu diesem Zweck wurden der Erythrocytensuspension einmal Nucleoside (Adenosin, Inosin), zum anderen Adenin sowie Ribose zugesetzt und nach 60-minütiger Inkubation die Lactat- und Pyruvatkonzentration gemessen. Es konnte jedoch bei den untersuchten Fischen keine Veränderung festgestellt werden (Tab. 22).

Tab. 15: ATP-Konzentration in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle
 Inkubationstemperatur: 25 °C

	Glucose (10 mmol/l)	t = 0	t = 60 min		t = 120 min
			μmol/ml		
Karpfen	-	7,08 ± 0,57 (20)	5,37 ± 0,95 (20) [†]	4,89 ± 0,86 (16) ^{†††}	-
	+		5,74 ± 0,18 (20) [†]	4,81 ± 0,92 (16) ^{†††}	47
Forelle	-	6,28 ± 0,52 (28)	4,96 ± 0,74 (15) [†]	4,35 ± 0,61 (14) ^{†††}	-
	+		5,15 ± 0,53 (17) [†]	4,70 ± 0,73 (14) ^{†††}	

† p < 0,05, ††† p < 0,001

Tab. 16: ATP-Konzentration in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle
unter dem Einfluß von NaF
Inkubationstemperatur: 25 °C

	Glucose (10 mmol/)	NaF (1 mmol/l)	t = 0	t = 60 min
			$\mu\text{mol/ml}$	
Karpfen	-	+	$6,99 \pm 0,48$ (7)	$5,42 \pm 0,88$ (7)
	+	+		$5,55 \pm 0,45$ (7)
	-	-		$5,65 \pm 0,75$ (7)
Forelle	-	+	$6,73 \pm 0,51$ (7)	$4,76 \pm 0,44$ (7)
	+	+		$4,77 \pm 0,58$ (7)
	-	-		$4,66 \pm 0,62$ (7)

Tab. 17: ATP-Konzentration in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle unter dem Einfluß von Methylenblau, Kaliumcyanid, Antimycin A und 2,4-DNP
Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 min

	Glucose (10 mmol/l)	-	Methylenblau (1 mmol/l)	Kaliumcyanid (1 mmol/l)	Antimycin A (1 mmol/l)	2,4-DNP (mmol/l)
						$\mu\text{mol/ml}$
Karpfen	-	5,61 $\pm$ 0,51 (10)	2,48 $\pm$ 0,47*** (7)	2,47 $\pm$ 0,42*** (10)	2,52 $\pm$ 0,53*** (9)	1,75 $\pm$ 0,32*** (8)
	+		2,31 $\pm$ 0,35*** (7)	2,82 $\pm$ 0,24*** (10)	2,62 $\pm$ 0,45*** (9)	2,10 $\pm$ 0,29*** (8)
Forelle	-	5,07 $\pm$ 0,53 (12)	2,38 $\pm$ 0,38*** (7)	2,99 $\pm$ 0,43*** (12)	2,25 $\pm$ 0,37*** (9)	1,75 $\pm$ 0,29*** (8)
	+		2,46 $\pm$ 0,27*** (7)	2,77 $\pm$ 0,39*** (12)	2,17 $\pm$ 0,35*** (9)	2,17 $\pm$ 0,26*** (8)

*** p < 0,001

Tab. 18: Die Konzentration von ADP in Erythrocyten-suspensionen vom Karpfen und von der Forelle unter dem Einfluß von KCN, Antimycin A, 2,4-DNP und Methylenblau

Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 Minuten

		Glucose (10 mmol/l)	Karpfen ADP (µmmol/ml)	Forelle
-	+		2,14 ± 0,26 (20)	2,61 ± 0,15 (15)
	-		1,72 ± 0,13 (20)	2,81 ± 0,13 (15)
	+	KCN (1 mmol/l)	7,13 ± 0,86 ^{***} (10)	8,56 ± 0,86 ^{***} (12)
	-		6,57 ± 1,35 ^{***} (10)	6,68 ± 0,88 ^{***} (12)
Antimycin A (1 mmol/l)	+		6,28 ± 0,35 ^{***} (9)	6,76 ± 1,08 ^{***} (9)
	-		6,27 ± 0,87 ^{***} (9)	6,37 ± 0,50 ^{***} (9)
	+	2,4-DNP (1 mmol/l)	10,65 ± 1,38 ^{***} (8)	7,70 ± 0,83 ^{***} (9)
	-		10,17 ± 0,66 ^{***} (8)	8,63 ± 1,38 ^{***} (9)
Methylenblau (1 mmol/l)	+		6,76 ± 0,76 ^{***} (7)	7,08 ± 0,98 ^{***} (7)
	-		5,88 ± 1,03 ^{***} (7)	6,80 ± 1,58 ^{***} (7)

^{***} p < 0,001

Tab. 19: Die Konzentration von AMP in Erythrocyten-suspensionen vom Karpfen und von der Forelle unter dem Einfluß von KCN, Antimycin A, 2,4-DNP und Methylenblau

Inkubationstemperatur: 25 °C, t = 60 Minuten

	Glucose (10 mmol/l)	Karpfen AMP (µmol/ml)	Forelle
-	+	1,73 ± 0,34 (20)	1,58 ± 0,33 (15)
	-	1,74 ± 0,23 (20)	1,65 ± 0,36 (17)
KCN (1 mmol/l)	+	3,11 ± 0,22** (10)	15,18 ± 2,12*** (12)
	-	4,06 ± 0,68*** (10)	15,84 ± 1,88*** (12)
Antimycin A (1 mmol/l)	+	3,46 ± 1,08** (9)	9,57 ± 2,33*** (9)
	-	3,85 ± 0,50** (9)	10,11 ± 2,08*** (9)
2,4-DNP (1 mmol/l)	+	3,63 ± 0,71** (8)	13,80 ± 1,36*** (9)
	-	4,27 ± 0,80** (8)	13,80 ± 1,33*** (9)
Methylenblau (1 mmol/l)	+	3,41 ± 0,28** (7)	7,20 ± 1,14*** (7)
	-	5,55 ± 0,38*** (7)	6,31 ± 0,88*** (7)

** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 20: Die Summe von ATP, ADP und AMP in Erythrocyten-suspensionen vom Karpfen und von der Forelle unter dem Einfluß von KCN, Antimycin A, 2,4-DNP und Methylenblau

		Glucose (10 mmol/l)	Karpfen µmol/ml	Forelle
-	-		9,24 $\pm$ 0,87 (20)	9,15 $\pm$ 1,02 (15)
	+		9,2 $\pm$ 0,78 (20)	9,61 $\pm$ 1,01 (17)
KCN (1 mmol/l)	-		12,71 $\pm$ 2,45** (10)	32,48 $\pm$ 3,19*** (12)
	+		13,45 $\pm$ 1,32*** (10)	25,27 $\pm$ 3,97*** (12)
Antimycin A (1 mmol/l)	-		12,27 $\pm$ 1,90** (9)	18,58 $\pm$ 2,95*** (9)
	+		12,75 $\pm$ 1,88** (9)	18,65 $\pm$ 3,76*** (9)
2,4-DNP (1 mmol/l)	-		16,03 $\pm$ 1,78*** (8)	23,25 $\pm$ 3,00*** (9)
	+		16,54 $\pm$ 1,78*** (8)	24,1 $\pm$ 2,45*** (9)
Methylenblau (1 mmol/l)	-		11,65 $\pm$ 1,88* (7)	16,67 $\pm$ 2,84*** (7)
	+		13,78 $\pm$ 1,39** (7)	15,57 $\pm$ 2,39*** (7)

* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001

Tab. 21: Der Einfluß der Anoxie (Begasung mit Stickstoff) auf die ATP-Konzentration in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle

	Glucose (10 mmol/l)	Karpfen	Forelle
		ATP ($\mu\text{mol/ml}$)	
Kontrolle t = 0	-	7,42 $\pm$ 0,65 (8)	5,85 $\pm$ 0,46 (9)
Kontrolle t = 60'	-	5,62 $\pm$ 0,32 (8)	4,72 $\pm$ 0,29 (9)
Begasung mit N ₂ t = 60'	-	6,11 $\pm$ 0,38 (8) ⁺	10,28 $\pm$ 0,49 (9) ⁺⁺⁺
Begasung mit N ₂ t = 60'	+	5,85 $\pm$ 0,43 (8)	10,62 $\pm$ 0,54 (9) ⁺⁺⁺

⁺ p < 0,05, ⁺⁺⁺ p < 0,001

Tab. 22: Die Konzentration von Lactat und Pyruvat in Erythrocytensuspensionen vom Karpfen und von der Forelle unter dem Einfluß von Adenosin, Inosin, Ribose und Adenin

	Karpfen		Forelle	
	Lactat	Pyruvat μmol/ml	Lactat	Pyruvat
-	3,29 ± 0,37 (8)	0,55 ± 0,04 (8)	3,12 ± 0,32 (8)	0,52 ± 0,06 (8)
Adenosin (10 mmol/ml)	3,85 ± 0,36 (8)	0,61 ± 0,05 (8)	3,22 ± 0,23 (9)	0,52 ± 0,05 (8)
Inosin (10 mmol/ml)	3,41 ± 0,27 (6)	0,55 ± 0,04 (6)	3,05 ± 0,35 (6)	0,48 ± 0,05 (6)
Ribose (10 mmol/ml)	3,79 ± 0,40 (7)	0,62 ± 0,06 (7)	3,26 ± 0,37 (7)	0,48 ± 0,04 (7)
Adenin (10 mmol/ml)	3,21 ± 0,37 (8)	0,56 ± 0,03 (8)	3,03 ± 0,28 (7)	0,53 ± 0,06 (7)

3. DISKUSSION

Im ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob Erythrocyten des Karpfens (*Cyprinus carpio*) bzw. der Forelle (*Salmo gairdneri* R.) Glucose verstoffwechseln.

Die Untersuchungen zeigen, daß unter in-vitro-Verhältnissen und aeroben Bedingungen die Erythrocyten beider Fischarten keine oder nur sehr unbedeutende Mengen von Glucose untilisieren; darauf deuten die Befunde hin, daß die Glucosekonzentration sich im Inkubationsansatz nicht verringerte und Metaboliten der Glykolyse wie Pyruvat und Lactat sich bei Inkubation mit Glucose nicht erhöhten (Tab. 5). Auch war in Anwesenheit von Natriumfluorid, das bekanntlich den Glucoseabbau hemmt, keine Erniedrigung der Lactat- und Pyruvatgehalte der Erythrocytensuspensionen zu beobachten. Schließlich entstanden in Anwesenheit radioaktiver Glucose keine radioaktiven Metaboliten (Abb. 3, 4).

Während bekanntlich beim kernlosen Säugetierythrocyten, wie im allgemeinen Teil bereits ausgeführt wurde, die Glykolyse hinsichtlich der Energiebereitstellung eine dominierende Funktion einnimmt, wird aus den Untersuchungen dieser Arbeit deutlich, daß der Energiestoffwechsel bei Karpfen- und Forellenerythrocyten nicht durch die Glykolyse bestimmt wird.

Der Befund, daß die Erythrocyten vom Karpfen und von der Forelle keine Glucose abbauen, ist erstaunlich, da die Arbeit gezeigt hat, daß glykolytische Enzyme vorhanden sind (Tab. 7).

Außerdem wiesen die Erythrocyten beider Spezies einen beträchtlichen ATP-Spiegel auf. Es war daher nahe-liegend, die mitochondriale ATP-Bildung eingehender zu untersuchen.

Dabei konnte gezeigt werden, daß die zelluläre ATP-Bildung wesentlich über die mitochondriale Atmung gespeist wird. Während NaF, das die glykolytische ATP-Bildung hemmt, zu keiner Beeinträchtigung der zellulären ATP-Bildung führte (Tab. 16), konnte der während der Inkubation auftretende Abfall des ATP durch Substanzen, die hemmend in die Atmung eingreifen, durch KCN, Antimycin A und 2,4-DNP, drastisch gesteigert werden (Tab. 17).

Diese Befunde zeigen, daß der ATP-Spiegel der Erythrocyten beider Spezies im wesentlichen über die oxidative Phosphorylierung bestimmt wird. Gleichzeitig verursachten die Substanzen einen Anstieg der ADP- und AMP-Konzentration (Tab. 16). Dabei zeigten sich speziesabhängige Unterschiede. Beim AMP machten sich diese Eingriffe bei der Forelle stärker als beim Karpfen bemerkbar. Daß es beim Abfall der ATP-Konzentration zu einem Anstieg von ADP und AMP kommt, ist nicht überraschend. In Tabelle 20 fällt aber auf, daß die Summe der Nukleotide bei Erythrocyten, deren Atmungskette gehemmt wurde, höher ist als die der Kontrolle. Das gilt vor allem für die Erythrocyten der Forelle. Den Tabellen 18 und 19 ist zu entnehmen, daß es offensichtlich unter diesen Umständen auch zu einer Neusynthese von Nukleotiden kommt (Tab. 20), wobei offenbar die Energie nur zur Bildung der energieärmeren Verbindungen, nämlich ADP und vor allem AMP ausreicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Einfluß der Anoxie auf den ATP-Spiegel untersucht. Überraschenderweise veränderte sich der ATP-Gehalt in Erythrocyten vom Karpfen kaum, im Falle der Forelle war sogar eine deutliche Zunahme der ATP-Konzentration zu beobachten. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt. Möglicherweise wurde unter den Versuchsbedingungen keine vollständige Anoxie erreicht. Von Untersuchungen am Hühnererythrocyten ist bekannt, daß eine 60-minütige Inkubation unter einer Stickstoffatmosphäre nicht ausreicht, um zu einer deutlichen Ausbildung anoxischer Effekte zu führen (128).

Geht man davon aus, daß die Regulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins vor allem bei der Forelle über ATP reguliert wird (127), so erscheint der festgestellte Anstieg des ATP-Spiegels physiologisch sinnvoll. Eine Erhöhung der ATP-Konzentration führt zu einer Abnahme der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins und begünstigt dadurch die Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe. In diesem Zusammenhang ist interessant, daß im Gegensatz zur Forelle beim Karpfen nicht ATP, sondern GTP eine dominierende Rolle bei der Regulation der Sauerstoffaffinität zukommt. Wie bereits erwähnt wurde, erhöhte sich der ATP-Spiegel bei Begasung mit Stickstoff kaum.

Auf Grund der Tatsache, daß beim Karpfen und bei der Forelle der mitochondriale Stoffwechsel die entscheidende Rolle bei der Energieversorgung der Erythrocyten spielt, stellte sich die Frage, ob durch Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels der glykolytische Stoffwechsel induziert werden kann.

Der mitochondriale Stoffwechsel steht, wie man seit den Untersuchungen von PASTEUR weiß, mit dem glykolytischen Stoffwechsel in Zusammenhang. Allerdings ist beispielsweise beim Hühnererythrocyten der sog. Pasteureffekt nicht wirksam (90). Eine Blockierung der mitochondrialen Aktivität führte zu keinem gesteigerten Glucoseabbau. Die Ursache wird darin gesehen, daß der Glucosetransport und nicht der Abbau der Glucose selbst den Umsatz bestimmenden Schritt darstellt.

Im Gegensatz dazu stehen die Befunde am Erythrocyten vom Karpfen und von der Forelle. Dort führte die Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch KCN, Antimycin A und 2,4-DNP in Anwesenheit von Glucose zu einem Anstieg von Lactat und Pyruvat. Dies deutet auf einen Glucoseumsatz hin.

Über die Stimulierung der Glykolyse wurde jedoch der ATP-Abfall nicht nennenswert verringert. Dies zeigt wiederum, daß der mitochondrialen Atmung bei der Bereitstellung von ATP eine vorherrschende Rolle zukommt.

Unter Begasung der Erythrocytensuspensionen mit Stickstoff führte auch hier die Anwesenheit von Glucose zur vermehrten Bildung von Lactat und Pyruvat.

Ähnlich wie die Begasung mit Stickstoff bzw. wie bei Eingriffen in die oxidative Phosphorylierung durch KCN, Antimycin A und 2,4-DNP erhöhte Glucose in Anwesenheit von Methylenblau die Pyruvatkonzentration in Erythrocyten vom Karpfen und von der Forelle. Außerdem war eine Abnahme der Glucosekonzentration zu beobachten (Tab. 8, 9).

Hingegen zeigte die Lactatkonzentration keine Veränderung, was wegen der oxidierenden Kapazität des Methylenblaus verständlich ist. Gleichzeitig verringerte sich auch die ATP-Konzentration. Dies ist offensichtlich darauf zurückzuführen, daß wegen der oxidierenden Wirkung von Methylenblau NADH der Atmungskette nicht mehr zur Verfügung steht. Damit ist eine ähnliche Situation gegeben wie bei den oben gegebenen Eingriffen in die oxidative Phosphorylierung. Auch dort führte eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung zu einer Induktion des Glucoseabbaus.

Unter Einwirkung von KCN, Antimycin A, 2,4-DNP sowie unter Begasung mit Stickstoff erhöhte sich der Lactat Spiegel; die Einschleusung des Lactats in den mitochondrialen Stoffwechsel unterbleibt. Unter normalen Umständen ist der Fischerythrocyt aber in der Lage, Lactat umzusetzen. Dies konnte in Versuchen gezeigt werden, in denen Lactat zugegeben wurde. Unter diesen Umständen kam es zu einer deutlichen Abnahme von Lactat und zu einer Zunahme von Malat und Pyruvat.

Überraschenderweise wurde Pyruvat, exogen zugesetzt, nicht in größerem Umfang umgesetzt. Es löste auch bei Lactat und Malat keine deutlichen Veränderungen aus.

Der geringfügige Anstieg des Pyruvat- und Lactatgehaltes während der Inkubation - unabhängig davon, ob Glucose zugesetzt wurde oder nicht - legt die Vermutung nahe, daß dies über andere Metaboliten ausgelöst wurde, etwa über eine Metabolisierung von Aminosäuren.

Eine Erhöhung der Lactat- und Pyruvatkonzentration, auch ohne Glucosezusatz, ergab sich, wenn KCN, Antimycin A

und 2,4-DNP zugesetzt wurde und unter Begasung mit Stickstoff; dies ist verständlich, da der weitere Abbau der Metaboliten in den Mitochondrien unterbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde des weiteren untersucht, ob Fischerythrocyten ähnlich der Glucose auch Ribose umsetzen. Hierfür ergab sich kein Hinweis; weder Ribose noch Purine, die den Riboseanteil enthielten, führten zu einer Erhöhung von Lactat und Pyruvat. Damit spielt die Ribose beim Erythrocyten von Karpfen und von der Forelle im Gegensatz zu den Erythrocyten vom Huhn (90) und Schwein (66, 67) keine Rolle bei der Energieversorgung.

Die Funktion des Blutes besteht u. a. darin, O_2 zu transportieren. In der Arbeit wurden zwei Spezies untersucht, die gegenüber dem Sauerstoffgehalt der Gewässer unterschiedliche Ansprüche stellen. Hinzuzufügen ist, daß die Forelle im Vergleich zum Karpfen von vornherein einen höheren O_2 -Umsatz hat (1, 111).

Die Frage ist, ob der unterschiedliche O_2 -Bedarf auch im Erythrocytenstoffwechsel zum Tragen kommt. Es zeigte sich in den Forellenerythrocyten unter Anoxie ein im Vergleich zum Karpfen deutlicher ATP-Anstieg. Das unterschiedliche Verhalten bezüglich der ATP-Bildung unter Anoxie wurde bereits im Zusammenhang mit der Funktion der organischen Phosphate bei der Regulation der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins diskutiert.

Weiterhin kommt in den Untersuchungen dieser Arbeit zum Ausdruck, daß, anders als der Karpfen, die Forelle

bei Hemmung der oxidativen Phosphorylierung in erheblichem Umfang AMP synthetisiert. Offensichtlich versucht der Erythrocyt auf diese Weise der Hemmung entgegen zu wirken, was jedoch auf Grund der Blockade des Stoffwechselweges nicht möglich ist.

Schließlich konnte aufgezeigt werden, daß Anoxie (Be-
gasung mit Stickstoff) beim Forellenerythrocyten zu
einer im Vergleich zum Karpfen, wesentlich deutlicheren
Lactatbildung führte.

In diesem Zusammenhang sind die Untersuchungen von
HOLETON und RANDALL (1976 a, b) an der Forelle und
von GAREY (1967) und LYKKEBOE und WEBER (1978) am
Karpfen interessant.

Die Autoren berichten, daß die Forelle unter hypoxischen
Bedingungen eine deutliche Lactatazidose ausbildet, der
Karpfen jedoch nur mit einer geringen Erhöhung der
Serum-Lactatwerte reagiert.

Die Tatsache, daß in der von LYKKEBOE und WEBER (1978)
untersuchten Versuchstiergruppe nur ein Karpfen unter
Hypoxie eine metabolische Azidose entwickelte, mag als
Hinweis dafür gelten, daß der Karpfen einen besonderen
Mechanismus entwickelt hat, der zur Verhütung der Azidose
beiträgt. Den Befunden dieser Arbeit zufolge erscheint es durch-
aus möglich, daß zur deutlichen Ausbildung der Lactat-
azidose der Forelle auch die Erythrocyten beitragen.

Insgesamt zeigen diese Befunde, daß die Erythrocyten vom
Karpfen und von der Forelle bei Sauerstoffmangel sowie
bei Hemmung der mitochondrialen Atmung unterschiedlich
reagieren.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welche Stoffwechselwege für die Energiebildung des Erythrocyten vom Karpfen (*Cyprinus carpio*) und von der Forelle (*Salmo gairdneri* R.) in Frage kommen.

Zu diesem Zweck wurde einmal untersucht, inwieweit Erythrocyten vom Karpfen und von der Forelle Glucose umsetzen, und zum anderen, inwieweit Eingriffe in die mitochondriale Oxidation Einfluß auf die Konzentration der organischen Phosphate haben.

Die Untersuchung ergab keinen Hinweis darauf, daß die Erythrocyten der beiden Fischarten unter normalen Bedingungen Glucose umsetzen; hingegen war eine glykolytische Aktivität dann nachweisbar, wenn die oxidative Phosphorylierung durch Substanzen wie KCN, Antimycin A oder 2,4-DNP gehemmt wurde bzw. die Erythrocyten unter einer Stickstoffatmosphäre inkubiert wurden. Unter diesen Umständen führte die Anwesenheit von Glucose im Inkubationsansatz zu einem deutlichen Anstieg der Lactat- und z. T. der Pyruvatkonzentration. In Gegenwart von Methylenblau führte Glucose zu einem deutlichen Anstieg der Pyruvatkonzentration in der Erythrocytensuspension, die Lactatkonzentration blieb unbeeinflusst.

Eine Hemmung der mitochondrialen Atmung durch KCN, Antimycin A, 2,4-DNP und Methylenblau führte zu einem deutlichen Abfall der ATP-Konzentration und gleichzeitig zu einem Anstieg von ADP und AMP. Unter diesen Bedingun-

gen war insbesondere der AMP-Spiegel der Forellenerythrocyten erhöht. Glucose übte keinen Einfluß auf diese Parameter aus.

Daraus ist zu schließen, daß die ATP-Konzentration bei Forellen- und Karpfenerythrocyten im wesentlichen über die oxidative Phosphorylierung bestimmt wird.

Überraschenderweise verringerte sich bei Inkubation unter Stickstoffatmosphäre der ATP-Gehalt der Erythrocyten jedoch nicht, im Falle der Forelle war sogar eine deutliche Zunahme festzustellen. Eine Klärung dieser Befunde auf biochemischer Basis ist auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht möglich. Möglicherweise wird über den ATP-Anstieg die Sauerstoffversorgung der Forelle verbessert.

Hinweise auf eine Metabolisierung von Ribose konnten in dieser Arbeit nicht erhalten werden.

SUMMARY

On the glucose- and mitochondrial energy metabolism of erythrocytes of the carp (*Cyprinus carpio*) and the trout (*Salmo gairdneri* R.)

The aim of the present work was to investigate metabolic pathways involved in the energy metabolism of carp and trout erythrocytes.

For this purpose glucose and mitochondrial energy metabolism was investigated.

No glycolytic activity in erythrocytes of carp and trout was observed under normal conditions; however utilization of glucose was induced when oxidative phosphorylation was inhibited by substances such as KCN, antimycin A or when incubation of the erythrocytes was performed under nitrogen atmosphere. Under these conditions a significant increase of lactate and - in part - of pyruvate concentrations was recorded. Addition of glucose released in the presence of methylene blue a pronounced increase of pyruvate but not of lactate concentration in the erythrocyte suspension.

An inhibition of mitochondrial respiration by KCN, antimycin A, 2,4-DNP and methylene blue lead to a significant decrease of ATP and concomitantly to an increase of ADP and of AMP concentration. Especially AMP levels of trout erythrocytes were enhanced under these conditions. Adding glucose was without any effect on these parameters.

This leads to the conclusion that ATP level is mainly regulated by the oxidative phosphorylation in carp and trout erythrocytes.

Surprisingly, no decrease of ATP content was recorded when erythrocytes were gassed with nitrogen; trout erythrocytes responded by a significant enhancement of ATP. On the basis of the data in this work no biochemical explanation can be given for this finding. It is suggested that the oxygen supply of the trout is improved under these conditions.

The experiments did not indicate a metabolization of ribose in fish erythrocytes.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALBRECHT, M. L., 1974
Der Sauerstoffverbrauch der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* R.)
Z. Binnenfischerei DDR 21, 53 - 61
2. ALBRECHT, M. L., 1974
Untersuchungen zur Kälteadaptation von Warmwasserkarpfen (*Cyprinus carpio* L.)
Z. Binnenfischerei DDR 21, 103 - 114
3. BALDWIN, J. M., 1975
Structure and function of hemoglobin
Prog. Biophys. Mo. Biol. 29, 225 - 320
4. BARTLETT, G. R., 1978
Phosphate compounds in reptilian and avian red blood cells; development changes
Comp. Biochem. Physiol. 61 A, 191 - 202
5. BARTLETT, G. R., 1980
Phosphate compounds in vertebrate red blood cells
Amer. Zool. 20, 103 - 114
6. BARTLETT, G. R., BORGESE, R., 1976
Phosphate compounds in red cells of the chicken and duck embryo and hatchling
Comp. Biochem. Physiol. 55 A, 207 - 210
7. BELL, D. J., 1971 a
Metabolism of the erythrocytes
In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl, Bell, D. J. and Freeman B. M. (eds.)
Academic Press New York, 863 - 872

8. BELL, D. J., 1971 b
In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl
Bell, D. J. and Freeman, B. M. (eds.)
Academic Press New York, 913 - 920
9. BELL, D. J., CULBERT, J., 1968
Plasmalactate in the hen - problems of its origin
Comp. Biochem. Physiol. 25, 627 - 637
10. BENESCH, R., BENESCH, R. E., 1967
The effect of organic phosphate from the human
erythrocyte on the allosteric properties of hemo-
globin
Biochem. Biophys. Res. Commun. 26, 162 - 167
11. BENESCH, R. BENESCH, R. E., 1974
The mechanism of interaction of red cell organic
phosphates with hemoglobin
Adv. Protein Chem. 28, 211 - 237
12. BENESCH, R., BENESCH, R. E., YU, C. I., 1968
Reciprocal binding of oxygen and diphosphoglycerate
by human hemoglobin
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 59, 526 - 532
13. BERGMAYER, H. U., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer,
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 432
14. BERGMAYER, H. U., BERNT, E., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer,
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 533 - 534

5. BERGMEYER, H. U., BERNT, E., SCHMIDT, F., STARK, H., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer, H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 1163 - 1168
16. BESCH, E. L., 1966
Respiratory activity of avian blood cells
J. Cell. Physiol. 67, 301 - 306
17. BESSIS, M., 1973
Living blood cells and their ultrastructure
Berlin - Heidelberg - New York: Springer, 125
18. BETKE, K., SAVELSBERG, W., 1950
Stufenphotometrische Hämoglobinbestimmung mittels Cyanhämoglobin
Biochem. Z. 320, 431 - 439
19. BISHOP, C., SURGENOR, D. M., 1964
The red blood cell
Acad. Press, New York 217
20. BOLIS, L., LULY, P., 1972
Monosaccharide permeability in brown trout salmo trutta L. erythrocytes
In: Role of membranes in secretory processes
Edited by L. Bolis, Keynes, R. D., Wilbrandt, W.
North - Holland Publishing Co., London and Amsterdam p. p., 215 - 221

21. BOLIS, L., LULY, P., BARONCELLI, V., 1971
D-Glucose permeability in brown trout *salmo trutta* L.
erythrocytes
J. Fish Biol. 3, 273
22. BORGESE, T. A., LAMPERT, L. M., 1975
Duck red cell 2,3-diphosphoglycerate; its presence
in the embryo and its disappearance in the adult
Biochem. Biophys. Res. Commun. 65, 822 - 827
23. BRAIN, M. C., CARD, R. T., 1972
In: Hemoglobin and red cell structure and function,
Brewer, C. J. (ed.)
24. BRAND, K., ARESE, P., RIVERA, M., 1970
Bedeutung und Regulation des Pentosephosphatweges
in menschlichen Erythrocyten
I: Versuche mit normalen Erythrocyten
Hoppe - Seylers Z. phys. Chemie 351, 501
25. BRAND, K., ARESE, P., RIVERA, M., 1970
Bedeutung und Regulation des PPZ in menschlichen
Erythrocyten
II: Versuche mit Erythrocyten mit einem Glucose-
6-phosphat-Dehydrogenase-Mangel
Hoppe - Seylors Z. phys. Chemie 351, 501
26. BREWER, G. J., 1972
In: Oxygen affinity of hemoglobin and red cell
acid base status
Rorth M. and Astrup P. (eds.), Alfred Benzon Symp. IV
Academic Press, New York, 609 - 610

27. BREWER, G. J., EATON, J. W., WEIL, J. V.,
GROVER, R. F., 1970
In: Red cell metabolism and function
Brewer, G. J. (ed.)
Plenum, New York, 95 - 114
28. BREWER, G. J., NOBLE, N. A., GILMA, J. G., CRENS, V. L.,
KRÜCKENBERG, V. C., 1978
In: The red cell
Brewer, G. J. (ed.), Alan R. Liss, Inc.
New York, 339 - 357
29. BREWER, G. J., OELSCHLEGEL, F. J. JR., SCHOOMAKER, F. B.,
KNUBEN, C. A., 1972 b
In: Red cell metabolism and function
Brewer, G. J. (ed.)
Plenum, New York, 99 - 119
30. CALESNICK, B., ALTARELLI, V. R., SPIRITES, M. A., 1960
Decrease in aerobic glycolysis following the continuous
administration of L-triiodothyronine
Endocrinology 66, 517 - 521
31. CAMERON, I. L., KRUSTBERG, M. L., 1969
DNA, RNA and protein synthesis during cyto-
differentiation of two types of chick cells
Cyto Bios 1, 229 - 238
32. CAMERON, I. L., PRESCOTT, D. M., 1963
RNA and protein metabolism in the maturation of
the nucleated chicken erythrocyte
Exp. Cell. Res. 30, 609 - 612

33. CHANUTIN, A., CURNISH, R. R., 1967
Effect of organic and inorganic phosphates on
the oxygen equilibrium of human erythrocytes
Arch. Biochem. Biophys. 121, 96 - 102
34. COLOWICK, S. P., 1973
The Hexokinases
In: The Enzymes, Boyer, P- D. (ed.), 3. Aufl., Bd. 9,
1 - 48
Academic Press, New York
35. CREVASSE, L., HEWSON, G., HAZOURI, G., SHIPP, J., 1965
Glucose metabolism of red blood cells study of
triiodothyronine on red blood cell metabolism
J. Lab. Clin. Med. 65, 539 - 544
36. CZOK, R., LAMPRECHT, W., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer,
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim , 1406 - 1408
37. DAJANI, R. M., ORTEN, J. M., 1958
A study of citric acid cycle in erythrocytes
J. Biol. Chem. 231, 913 - 924
38. D'AMELIO, V., CONSTANTINO - CECARINI, E., 1969
Amino acid uptake, protein synthesis and poly-
ribosome profiles in maturing erythroid cells
from chick embryos
Exp. Cell. Res. 56, 1 - 9

39. ELDJARN, L., BREWER, J., 1962
Influence of the redox state of glutathion upon
pyruvate kinase in the intact erythrocyte
Biochem. J. 84, 286 - 291
40. FINCH, C. A., LENFANT, C., 1972
Oxygen transport in man
N. Engl. J. Med. 286, 407 - 415
41. FREY and BLACK, 1947
Zit. n. W. SCHÄPERCLAUS
Fischkrankheiten, 4. Aufl.
Akademie - Verlag, Berlin, 811
42. GAREY, W. F., 1967
Gas exchange, cardiac output and blood pressure
in free swimming carp (*Cyprinus carpio*)
PH. D. Dissertation, University of New York, Buffalo,
New York
43. GEOGHEGAN, W. D., POLUHOWICH, J. J., 1974
The major erythrocytic organic phosphates of
American eel, *Anquilla rostrata*
Comp. Biochem. Physiol. 49 B, 281 - 290
44. GILLEN, R. G., RIGGS, A., 1971
The hemoglobins of a fresh-water teleost, *cichlasoma*
cyanoguttatum (Baird and Guard)
I. The effects of phosphorylated organic compounds
upon the oxygen equilibria
Comp. Biochem. Physiol. 38 B, 385 - 595

45. GILLEN, R. G., RIGGS, A., 1972
Structure and function of the hemoglobin of the
carp, *Cyprinus carpio*
J. Biol. Chem. 247, 6039 - 6046

46. GILLEN, R. G., RIGGS, A., 1973 a
The hemoglobin of a fresh-water teleost,
cichlasoma cyanoguttatum (Baird and Guard)
II: Subunit structure and oxygen equilibria of
the isolated components
Arch. Biochem. Biophys. 154, 348 - 359

47. GILLEN, R. G., RIGGS, A., 1973 b
Structure and function of the isolated hemoglobin
of the American eel, *Anquilla rostrata*
J. Biol. Chem. 248, 1961 - 1969

48. GREENWALD, J., 1925
A new type of phosphoric acid compound isolated
from blood with some remarks on the effect of
substitution on the rotation of L-glyceric acid
J. Biol. Chem. 63, 339 - 349

49. GUTMAN, J. and BERNT, E., 1973
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.), 739 - 734
Verlag Chemie, Weinheim

50. GYLSTORFF, I., 1983
In: Handbuch der Geflügelphysiologie 1983, I. Teil, 290
Mehner, A., Hartfield, W. (eds.)
S. Karger, Basel, München

51. HASART, E., ROIGAS, H., 1968
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion der
Erythrocyten, Berlin 1967
Folia haemotol. (Lpz.) 89, 479
52. HASART, E., JACOBASCH, G., RAPOPORT, S., 1970
Der Einfluß der Temperatur auf die Regulation der
Glykolyse in Erythrocyten des Menschen und der Ratte
Acta. Biol. Med. German. 24, 725
53. HOCHACHKA, P. W., 1980
Living without oxygen
Harvard University Press, Cambridge (Mass.) 78
54. HOHORST, H. J., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 1424 - 1427
55. HOHORST, H. J., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 1543 - 1547
56. HOLETON, G. F., RANDALL, D. J., 1967 b
The effect of hypoxia upon the partial pressure of
gases in the blood and water afferent and efferent
to the gills of rainbow trout
J. Exptl. Biol. 64, 317 - 327
57. HOLETON, G. F., RANDALL, D. J., 1967 a
Changes in blood pressure in the rainbow trout
during hypoxia
J. Exptl. Biol. 46, 297 - 305

58. IRVING, L., BLACK, E. C. and SAFFORD, V., 1941
The influence of temperature upon the combination
of oxygen with the blood of trout
Bil. Bull. 80, 111 - 115
59. ISAACKS, R. E., HARKNESS, D. R., 1980
Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin
function in birds, reptiles and fishes
Am. Zool. 20, 115 - 129
60. ISAACKS, R. E., HARKNESS, D. R., 1975
2,3-Diphosphoglycerate in erythrocytes of chicken
embryo
Science, 189, 393 - 394
61. JAKOBASCH, G., 1967
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion der
Erythrocyten, Berlin, 1967
Folia haemoto. (Lpz.) 89, 390, 1968
62. JAWOREK, D., GRUBER, W., BERGMAYER, H. U., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 2020 - 2033
63. JAWOREK, D., GRUBER, W., BERGMAYER, H. U., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 2051 - 2055
64. KALOUSTIAN, K. V. and POLUHOWCH, J. J., 1976
The role of organic phosphates in modulating the
oxygenation behaviour of eel hemoglobin
Comp. Biochem. Physiol. 53 A, 245 - 248

65. KIM, H. D., DUHM, J., 1974
Postnatal decrease in the oxygen affinity of pig
blood induced by red cell 2,3-DPG
Am. J. of Physiol. Vol 226No4, 1001 - 1006
66. KIM, H. D., Mc. MANUS, T. J., 1971 a
Studies on the energy metabolism of pig red cells
I: The limiting role of membrane permeability in
glycolysis
Biochem. et Biophys. Acta 230, 1 - 11
67. KIM, H. D., Mc. MANUS, T. J., 1971 b
Studies on the energy metabolism of pig red cells
II: Lactate formation from free ribose and desoxy-
ribose with maintenance of ATP
Biochem. et Biophys. Acta 230, 12 - 19
68. KIM, H. D., ISAACKS, R. E., 1973
The membrane permeability of nonelektrolytes and
carbohydrate metabolism of Amazon fish red cells
Can. J. Zool. Vol. 56, 1, 863 - 869
69. KLINGER, D., 1983
Über den Glucosestoffwechsel des Hühnererythrocyten
in der prä- und neonatalen Phase
Inaugural-Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universi-
tät München, 1983
70. KREGENOW, F. W., 1977
In: Membrane transport in red cells
Ellory J. C., Lew V. L. (eds.)
Academic Press London, New York, San Francisco,
383 - 426

71. KRIMSKY, L., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.)
Verlag Chemie, Weinheim, 1396 - 1399
72. KÜHN, B., JAKOBASCH, G., RAPOPORT, S., 1968
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion der
Erythrocyten, Berlin, 1967
Folia haematolog. (Lpz.) 89, 450
73. LE FEVRE, P. G., 1961
Sugar transport in the red cells: structure -
activity relationship in substrates and antagonists
Pharmacology 13, 39 - 70
74. LÖHR G. W. und WALLER, M. D., 1970
In: Methoden der enzymatischen Analyse, Bergmeyer
H. U. (ed.), Bd. 1, 599 - 616
Verlag Chemie, Weinheim
75. LYKKEBOE, G., WEBER, R. E., 1978
Changes in the respiratory properties of the blood
in the carp, cyprinus carpio, induced by diurnal
variation in ambient oxygen tension
J. Comp. Physiol. 128, 117 - 125
76. LERAY, C., 1979
Patterns of purine nucleotides in fish erythrocytes
Comp. Biochem. Physiol. 64B, 77 - 82
77. MC MANUS, T. J., 1967
Comparative biology of red cells
Federation Proceedings 26, 1821

78. MC MANUS, T. J., 1974
Alternate pathways for metabolism: a comparative view
In: The human red cell in vitro
T. J. Greenwalt, G. A. Jamieson (eds.), p. p. 49 - 63
79. MINAKAMI, S., 1969
Effect of oxygen tension on glycolysis in erythrocytes
Försvars-medicin 5, 181 - 186
80. MINAKAMI, S., YOSHIKAWA, H., 1966
Studies on erythrocyte glycolysis
J. Biochem. , 139 - 144
81. MOORE, L. G., BREWER, G. L., OELSCHLEGEL, F. J., 1972
In: Hemoglobin and red cell structure and function,
Brewer, G. J. (ed.)
Plenum, New York, 397 - 413
82. MORGAN, H. E., WHITFIELD, C. F., 1973
Metabolic and hormone regulation of sugar transport
in eukaryotic cells
In: Current topics in membranes and transport
Bronner F., Kleinzeller A. (eds.)
Acad. Press, New York Vol4, 255 - 303
83. OKAZAKI, T., MISAWA, J., SHUKUYA, R., 1974
The effects of organic phosphates on the oxygen equilibria
of two distinct hemoglobins of the eel, *Anquilla japonica*
Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 1031 - 1037
84. OSCHIMA, M., TAYLOR, T. G., WILLIAMS, A., 1964
Variations in the concentration of phytic acid in
the blood of the domestic fowl
Biochem. J. 92, 42 - 46

85. OSKI, F. A., GOTTLIEB, A. J., 1971
The interrelationships between red blood cell metabolites hemoglobin and the oxygen-equilibrium curve
Prog. Hematol. 7, 33 - 67
86. PARKS, R. E. JR., BROWN, P. R., CHENG, Y. C.,
AGARWAL, K. C., KONG, C. M., AGARWAL, R. P., PARKS, C. C.,
1973
Purine metabolism in primitive erythrocytes
Comp. Biochem. Physiol. 45 B, 355 - 364
87. PENZLIN, H., 1980
Tierphysiologie, 3. Aufl.
G. Fischer Verlag, Stuttgart, 265
88. PERUTZ, M. F., PULSINELLI, P. D., CANNEY, H. M., 1972
In: Hemoglobin and red cell structure and function
Brewer G. J. (ed.)
Plenum, New York, 3 - 18
89. PETERSON, A. J., POLUHOWICH, J. J., 1976
The effects of organic phosphates on the oxygenation
behaviour of eel multiple hemoglobins
Comp. Biochem. Physiol. 55 A, 351 - 354
90. PFANN, G., 1984
Über den Glucose- und mitochondrialen Energiestoff-
wechsel des Hühnererythrocyten
Inaugural - Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität
München, 1984
91. POWERS, D., 1980
The molecular ecology of teleost fish hemoglobins:
Strategies for adapting to changing environments
Amer. Zool. 20, 139 - 162

92. PURICH, D. L., FROMM, H. J., RUDOLPH, F. B., 1973
The hexokinases
Adv. Enzymol. 39, 249 - 326
93. QVIST, J., WEBER, R. E., DE BRIES, A. L., ZAPOL, W. M.,
1977
PH and hemoglobin oxygen affinity in blood from the
antarctic cod, *dissostichus mawsoni*
J. Exp. Biol. 67, 77 - 88
94. RAPOPORT, S., 1968
The regulation of glycolysis in mammalian erythrocytes
In: Essays in biochemistry, Campbell, P. N., Greville,
G. D. (eds.)
Acad. Press, New York, Vol 4, 69 - 103
95. RAPOPORT, S., 1967
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion, Berlin 1967
Folia haematol. (Lpz.) 89, 105
96. RAPOPORT, S. und JACOBASCH, G., 1968
Über die Regulation des Energiestoffwechsel des Ery-
throcyten
Aus: Metabolism and membrane permeability of erythro-
cytes and thrombocytes
Deutsch E., Gerlach E., Moser, K., 1 - 11
97. RAPOPORT, S. and GUEST, G. M., 1941
Distrubution of acid-soluble phosphorus in the blood
cells of various vertebrates
J. Biol. Chem. 138, 269 - 282
98. RAPOPORT, S., LUEBERING, J., 1950
The formation of 2,3-diphosphoglycerate in rabbit
erythrocytes
The existence of a diphosphoglycerate mutase
J. Biol. Chem. 183, 507

99. RAPOPORT, S., LUEBERING, J., 1951
Glycerate-2,3-diphosphatase
J. Biol. Chem. 189, 683
100. RAPOPORT, S., LUEBERING, J., 1952
An optical study of diphosphoglycerate mutase
J. Biol. Chem. 196, 583
101. RAPOPORT, S., NIERADT, C., 1955
In wie weit verläuft die Glykolyse im Säugetiererythrocyten über 2,3-Diphosphoglycerinsäure? Über eine Variante des Glykolytischen Zyklus auf dem Niveau der Phosphoglycerinsäuren
Biochem. Z., 326 - 231
102. ROIGAS, H., 1968
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion der Erythrocyten, Berlin 1967
Folia haematol. (Lpz.) 89, 472
103. ROSE, I. A., O'CONNELL, E. L., 1964
The role of glucose-6-phosphate in the regulation of glucose metabolism in human erythrocytes
J. Biol. Chem. 239, 12
104. ROSE, I. A., WARMS, J. V. B., O'CONNELL, E. L., 1964
Role of organic phosphate in stimulating the glucose utilisation of human red blood cells
105. ROST, J., KNÜFEL, R., 1967
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion der Erythrocyten, Berlin 1967
Folia haematol. (Lpz.) 89, 203

106. RUBINSTEIN, D., DENSTEDT, O. F., 1953
The metabolism of erythrocyte
III. The tricarboxylic acid cycle in avian erythrocyte
J. Biol. Chem. 204, 623 - 637
107. RUSSEL E., HARKNESS, D., HARKNESS, I., 1980
Erythrocyte organic phosphates and hemoglobin function
in birds, reptiles and fishes
Amer. Zool. 20, 115 - 129
108. RUUD, J. T., 1954
Vertebrates without erythrocytes and blood pigment
Nature 173, 848 - 850
109. SACHS, L., 1978
Angewandte Statistik
Springer Verlag
110. SANDRING, K.-H., RHODE, A., ROST, J., 1967
V. Intern. Symp. über Struktur und Funktion der Erythrocyten, Berlin 1967
Folia haematol. (Lpz.) 89, 208
111. SCHÄPERCLAUS, W., 1979
Fischkrankheiten, 4. Auflage
Akademie - Verlag, Berlin, 809 - 811
112. SCHERRER, K. L., MARCUAD, L., ZAJDELA, F., LONDON, I. M.
and GROS F., 1966
Patterns of RNA metabolism in a differentiated cell:
A rapidly labeled, unstable 60 s-RNA with messenger
properties in duck erythroblasts
8 Acad. 124, Proc. Nat. Ac. ad. Sci. USA 56, 1571 - 1578

113. SHOUBRIDGE, F. A., HOCHACHKA, P. W., 1982
Äthanol - ein Endprodukt des anaeroben Stoffwechsels
von Fischen
Biologische Rundschau 20, 178
114. SCHRÖTER, W., 1968
Regulation des 2,3-Diphosphoglycerat-Zyklus in den
roten Blutzellen des Menschen
In: Metabolism and membrane permeability of erythro-
cytes and thrombocytes
Deutsch, E., Gerlach, E., Moser, K. (eds.), 50 - 66
115. SCHULTZE, M., 1964
Über die Wege des Glucosabbaus beim Retikulocyten
Acta biol. med. germ. 13, 310
116. SCHWEIGER, H. G., 1962
Pathways of metabolism in nucleate and anucleate
erythrocytes
Int. Rev. Cytol. 13, 135 - 201
117. SCOTT, A. E., BUNN, M. R., BRUSH, A. J., 1977
The phylogenetic distribution of red cell 2,3-di-
phosphoglycerate and its interaction with mammalian
hemoglobins
J. Exp. Zool. 201, 269 - 288
118. STEFFENS, W., 1955
Der Einfluß von Umweltfaktoren auf die Höhe des Hämog-
lobingehaltes und auf die Erythrocytenzahl beim Karpfen
Z. Fischerei 4, 161 - 188
119. STRUMIA, M. M., SAMBLE, A. B., HART, E. D., 1954
An improved microhematocrit methode
Amer. J. clin. Path. 24, 1016 - 1024

120. TOPF, W., 1955
Die Blutbildung und die Blutbildungsstätten beim
Karpfen (*Cyprinus carpio* L.)
Z. Fischerei 4, 257 - 288
121. TOTESON, D. C., JOHNSON, J., 1957 a
The coupling of potassium transport with metabolism
in duck red cells
J. Cell, Comp. Physiol. 50, 169 - 184
122. TSUBOI, K. K., FUKUNAGA, D., 1965
Inorganic phosphate and enhanced glucose degradation
by the intact erythrocyte
J. Biol. Chem. 240, 2806
123. WEBER, R. E., LYKKEBOE, G., 1978
Respiratory adaptations in carp blood. Influences of
hypoxia, red cell organic phosphates, divalent cations
and CO₂ on hemoglobin-oxygen affinity
J. Comp. Phys. 128 B, 127 - 137
124. WEBER, R. E., LYKKEBOE, G., JOHANSEN, K., 1975
Biochemical aspects of the adaptations of hemoglobin-
oxygen affinity of eels to hypoxia
125. WEBER, R. E., LYKKEBOE, G., JOHANSEN, K., 1976 a
Physiological properties of eel hemoglobin:
Hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity
J. Exp. Biol. 64, 75 - 88
126. WEBER, R. E., DE WILDE, J. A. M., 1975
Oxygenation properties of hemoglobins from the flat
fish plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder
(*Platichthys flexus*)
J. Comp. Physiol. 101 B, 99 - 110

127. WEBER, R. E., WOOD, S. C., LOMHOLT, J. P., 1976 b
Temperature acclimation and oxygen binding properties
of blood and multiple hemoglobins of rain bow trout
J. Exp. Biol. 65, 333 - 345
128. WHITFIELD, D. F., 1976
Effect of anoxia on sugar transport in avian erythro-
cytes
Biochem. et Biophys. Acta, 181 - 196
129. WHITTAM, R., 1964
Transport and diffusion in red blood cells
E. Arnold, LTD, London, 116 - 120
130. WILLIAMS, R. H., ENSINCK, J. W., 1966
Secretion, fates and actions of insulin and related
products
Diabetes 15, 623
131. WOLF, K., 1963
Physiological salines for fresh water teleosts
Prog. Fish Cult. 25, 135 - 140
132. WOOD, S. C., JOHANSEN, K., WEBER, R. E., 1975
Effect of ambient P_{O_2} on hemoglobin-oxygen affinity
and red cell ATP concentrations in a benthic fish,
pleuronectes platessa
Respir. Physiol. 25, 259 - 267
133. WOOD, S. C., JOHANSEN, K., 1972
Adaptation to hypoxia by increased HbO_2 affinity
and decreased red cell ATP concentration
Nature (London), New Biol. 237, 278 - 279

134. WOOD, R. E., MORGAN, H. E., 1969

Regulation of sugar transport in avian erythrocytes
J. Biol. Chem. 244, 1451 - 1460

135. ZEIDLER, R. B., LEE, P., KIM, H. D., 1976

Kinetics of 3-o-methyl glucose transport in red blood
cells of newborn pigs

J. Gen. Physiol. 67, 67 - 80

DANKSAGUNG

Für die Überlassung der Arbeitsmöglichkeiten zur Durchführung meiner Untersuchungen möchte ich dem geschäftsführenden Vorstand des Instituts, Herrn Prof. Dr. H. Zucker herzlich danken.

Ganz besonders bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann für die freundliche Überlassung des Themas und für die bereitwillig gewährte Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. R. D. Negele, der keine Möglichkeit unversucht ließ, mir bei Beschaffung und Hälterung von Fischen behilflich zu sein.

An dieser Stelle sei auch Herrn Direktor Dr. M. Bohl von der Versuchsanlage der Bayerischen Landesanstalt für Wasserforschung in Wielenbach für die Erlaubnis, das Labor des Instituts benützen zu dürfen, herzlich gedankt.

Frau Dipl. Biol. K. van de Graaf und Herrn Dr. W. Schäfer vom Zoologischen Institut danke ich für die stets gern gewährte Hilfe bei der Durchführung der Versuche.

Herrn Prof. Dr. Hoffmann vom Zoologischen Institut danke ich für die zeitweilige Bereitstellung eines Beckens zur Hälterung der Versuchstiere.

Frau B. Hofer, Frau B. Amann, Herrn Fleischmann, Herrn Reiter und allen, die mir durch ihr Entgegenkommen die Arbeit erleichterten, sei herzlich gedankt.

LEBENS LAUF

Geboren: 19. Juli 1953 in Berlin

Eltern: Hellfried Kalk, Dipl. Ing.
Ursula Kalk, geb. Adler

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbesuch: 1960 - 1963 Volksschule Hiltrup/Münster
1963 - 1964 Volksschule Wetter/Ruhr
1964 - 1965 Gymnasium Wetter/Ruhr
1965 - 1973 Gymnasium Hersbruck

Abitur: Juli 1973 am Gymnasium Hersbruck

Bundeswehr: Oktober 1973 bis 1974 Sanitätsakademie
der Bundeswehr in München

Studium: 1975 - 1977 Chemie Diplom
an der Universität Erlangen
1977 - 1982 Tiermedizin
an der LMU München

Staatsexamen und
Approbation als Tierarzt: 1982 in München

Weitere Tätigkeit: 1982 Hospitant in einer Gemischt-tier-
praxis und Tätigkeit als Besamungs-
techniker

Institutstätigkeit: Beschäftigung am Institut für Physiologie,
Physiologische Chemie und Ernährungs-
physiologie der Tierärztlichen Fakultät
der LMU München:
seit 1. Februar 1983 als Doktorand
vom 1. 12. 1983 bis 21. 07. 1984 und
vom 1. 11. 1984 bis 31. 12. 1984
als teilzeitbeschäftigte wissenschaft-
liche Hilfskraft

